



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización del remodelador de cromatina  
CHD6: control de la proliferación celular y  
mecanismos de reclutamiento a sus genes diana**

---

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN PABLO CHAVEZ GONZALEZ**

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

# Caracterización del remodelador de cromatina CHD6: control de la proliferación celular y mecanismos de reclutamiento a sus genes diana

---

Memoria presentada para optar al título de Doctor  
por:

**Juan Pablo Chávez González**

MADRID, MAYO 2015

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido  
realizado en el del Centro Nacional de  
Biotecnología bajo la dirección de la **Dra. Amelia  
Nieto Martín**

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido  
posible gracias al disfrute de una beca pre-doctoral  
de La Caixa





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis Amelia Nieto, por todo su apoyo tanto científico como no científico (llámese laboral/moral/persona/etc) que me ha brindado a través de estos seis años. Gracias Amelia por toda tu confianza y especialmente por tu cordura, claridad y honestidad en cada momento, gracias sobre todo por esa descomunal paciencia que has tenido conmigo y que algunas veces llevé al límite ¡desde luego que soy un privilegiado!. Gracias por permitirme formar parte de tu grupo y hacerme sentir como una persona que trabaja con personas y no como un simple predoc inmigrante que solo vino a hacer experimentos. He de decir, sin ser un “quedabien” que soy muy afortunado de haber “caído” en tu laboratorio, con una excelente jefa y unos compis muy majos pero sobre todo profesionales. Después de escuchar tantas historias “CNBrezcas” creo que si no me hubieras aceptado o yo hubiera elegido mal, seguramente habría terminado con desórdenes mentales y/o traumas psicológicos. Todo mundo sabe que esta tesis no habría visto la luz, sino me hubieras insistido y presionado en los momentos difíciles que estuve a punto de tirar la toalla. Por todo esto y más GRACIAS jefa.

Quiero agradecer a Bob, por todo el apoyo y asesoramiento científico que me brindó durante mis primeros en el laboratorio. Gracias Bob por enseñarme todas las “pormenores” y curiosidades de CHD6. Siempre estuviste dispuesto a ayudarme en lo que fuera, incluso cuidar de mi hámster cuando me fui de vacaciones, también gracias a tu madre por tener que controlar a sus perros y gatos para que no se lo comieran.

Agradezco también a mi vecina de escritorio, contemporánea y amiga Paloma por enseñarme la dinámica del laboratorio y darme ánimos en mis momentos nostálgicos. Gracias Palomita por introducirme en el campo de las cuantitativas, aprendí muchísimo contigo. Gracias también por hacerme los congresos mucho más llevaderos y bajarme “tres niveles” de estrés y nerviosismo. Y tengo que decirlo, pero gracias también por mostrarme (y generarme preocupación/envidia) esos protocolos inmaculados que cada vez que los veía me cegaban por su luz resplandecedora.

Quiero agradecer a Ariel, que ya se ha ido a E.U.U. para cambiar de aires, por toda su sabiduría y experiencia como post-doc. Por aconsejarme con el montón de “quilombos” migratorios y también por todas esas broncas que echaba cuando hacía mal las cosas, la verdad es que lo tenía muy merecido.

También agradezco a Cata, post-doc del laboratorio con quien compartí poyata por un tiempo. Gracias Cata por tan buenas charlas y “momentos galleta” que teníamos cuando todo mundo se iba. Tuvimos muy pocos momentos fuera del CNB, me habría gustado compartir más, siempre fuiste tan amable conmigo y muy buena escucha.

Gracias Alex, mi amiga “intensa” con quien siempre cuento para todo (menos para una cañas, pero si zumos). Siempre tan enérgica, positiva y con un montón de ideas. He vivido muchos momentos contigo y he tenido el honor de conocer a tu familia (-¡madre mía! Lo intenso viene de sangre) has sido una gran confidente y espero seguir en contacto contigo aunque te vayas a Japón.

Santí, nuestro DDR. del laboratorio, con quien a pesar de haber estado poco tiempo en el labo ( -bueno, a mí me supo a poco) congeniamos muy bien. Gracias Santí por tu amistad y por esos grandes momentos cargados de muchas risas, dentro y fuera del CNB. El viaje que hicimos a Galicia contigo Alex, Richy y yo, ha sido de mis mejores momentos en España.

Gracias Laura, por tu gran amistad y por todas tus buenas ideas ¡para ahorrar tiempo en los protocolos! eres el ejemplo más claro de una mujer práctica y "multi-tasking", puedes estar hablando de tu finde, hacer geles y estar escribiendo un proyecto todo al mismo tiempo. Eres de esas personas que siempre encuentran soluciones, no problemas; siempre recordaré esa imagen tuya recogiendo del suelo una inmunoprecipitación para salvar el experimento. Gracias también por tus buenos consejos y tu empatía durante estos años.

Gracias Ana, que aunque eres relativamente nueva en el 118, tu trayectoria en el grupo es de las más largas. Tu participación tan activa en los seminarios de laboratorio y tu gran experiencia como post-doc han aportado mucho al grupo. Eres inteligente, eficiente y muy productiva, siempre con un ojo al gato y otro al garabato. Otra cosa no, pero siempre podíamos hablar series como Bates Motel.

Quiero agradecer también a Juan Ortín, jefe de laboratorio 116 y un gran líder. Siempre con ganas de ayudar, aportando con sus ideas brillantes y concisas en todos los seminarios.

Gracias a toda la gente que formó parte del 116 (Yolanda, Sara, Lorena, Joan, Maite, Susana, Rocío y Patri) y al grupo de Pablo Gastaminza: Lidia, Martina y Claudia.

Por supuesto también quiero agradecer tanto a mi familia en México, mis padres y hermanos, como mi familia en Madrid, Ale, Meli y Daya. Todos ellos GRACIAS por soportarme por todos estos años, con mis numerosos olvidos, mis problemas migratorios, mis depresiones y un largo etcétera...La verdad es que no encuentro palabras para expresar mi gratitud por todo el apoyo emocional, espiritual y económico que me han brindado fortuitamente.

Richy, mi pareja, por ser la razón para seguir en España y que me ha dado innumerables veces palabras de aliento y cariño para no desistir en mi objetivo. Muchas GRACIAS por aguantarme aquellas noches de cinética infernal, por mis repentinos cambios de humor, los fines de semana que te "tocaba" acompañarme para cargar geles y sobre todo por los largos meses de daños colaterales de escribir la tesis.

Por último, quiero agradecer a la fundación *Obra Social La Caixa* por otorgarme la beca de doctorado con la que pude vivir en España, cursar el máster y realizar mi trabajo en el CNB.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>I. LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN .....</b>	<b>7</b>
I.1 La estructura y organización de la cromatina .....	7
I.2 El proceso de transcripción .....	10
I.3 Maquinaria general de la transcripción .....	11
I.4 Factores de transcripción .....	12
<b>II. MODIFICACIÓN DE LA CROMATINA Y REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN .....</b>	<b>13</b>
II.1 Metilación del DNA .....	13
II.2 Modificaciones post-traduccionales de histonas .....	14
<b>III. REMODELADORES DE CROMATINA ATP-DEPENDIENTES .....</b>	<b>21</b>
III.1 SNF2/ISWI .....	22
III.2 INO80 .....	22
III.3 ISWI .....	23
III.4 CHD .....	23
<b>IV. LA FAMILIA CHD COMO REGULADORES DEL CICLO CELULAR .....</b>	<b>27</b>
IV.1 El ciclo celular .....	27
IV.2 Regulación transcripcional del ciclo celular .....	28
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>

I. MATERIALES BIOLÓGICOS .....	35
I.1 Líneas celulares eucariotas.....	35
I.2 Plásmidos.....	35
I.3 Secuencias para la construcción de plásmidos de silenciamiento.....	35
I.4 Anticuerpos .....	35
I.5 Oligonucleótidos.....	36
I.6 <i>Microarray</i> de oligonucleótidos.....	37
I.7 Inmunoprecipitación de cromatina .....	37
I.8 Array de péptidos modificados .....	37
I.9 Resinas para purificación de His-proteínas.....	37
I.10 Reactivos y otros materiales biológicos .....	37
II. MÉTODOS .....	37
II.1 Manipulación de cultivos celulares.....	37
II.2 Métodos de manipulación y análisis de DNA .....	38
II.3 Métodos de manipulación y análisis de RNA .....	40
II.4 Métodos bioinformáticos .....	42
II.5 Análisis de ciclo celular .....	45
II.6 Métodos de análisis de proteínas (SDS-PAGE).....	46
II.7 Purificación de His-proteínas .....	46
II.8 Métodos inmunológicos e inmunohistoquímicos.....	48
II.9 Métodos de análisis de modificaciones de histonas .....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	53
I. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN EN CÉLULAS SILENCIADAS PARA CHD6 .....	53
I.1 Silenciamiento de CHD6 en células HEK293T.....	53
I.2 El silenciamiento de CHD6 induce una expresión diferencial de genes .....	53
I.3 Procesos biológicos enriquecidos en genes regulados por CHD6. La regulación negativa de la transcripción por RNAP II, regulación negativa del ciclo celular y remodelación de la cromatina.....	61
I.4 Factores de transcripción regulados por CHD6 .....	64



I.5	Enriquecimiento de motivos comunes de unión a factores de transcripción se encuentran sobrerrepresentados en genes regulados por CHD6.....	67
I.6	Búsqueda sesgada de anotaciones biológicas en familias de factores de transcripción con motivos enriquecidos en genes regulados por CHD6 .....	69
II.	VALIDACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA Y FUNCIÓN DE CHD6 EN EL CICLO CELULAR.....	71
II.1	Validación del transcriptoma de células silenciadas para CHD6 y regulación de los niveles de expresión de los genes GDF15, NEDD4 y HPRT1 .....	71
II.2	Función de CHD6 en el ciclo celular .....	78
III.	INTERACCIÓN DE CHD6 Y SUS CROMODOMINIOS CON MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS.....	82
III.1	CHD6 y su interacción con modificaciones de histonas.....	84
III.2	Hi-cromodominios de CHD6.....	96
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	109
I.	GENES MODULADOS POR CHD6 COMO POSIBLES REGULADORES DE SU FUNCIÓN DE ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	110
I.1	Genes <i>up</i> -regulados.....	111
I.2	Genes <i>down</i> -regulados .....	113
II.	FUNCIÓN DE REMODELADORES DE CROMATINA EN PROLIFERACIÓN CELULAR.....	114
III.	MECANISMOS DE RECLUTAMIENTO DE CHD6 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS .....	115
III.1	Dominios reconocidos por familias de factores de transcripción en los genes regulados por CHD6.....	115
III.2	Modificaciones post-traduccionales reconocidas por CHD6.....	117
III.3	La metilación en H4K20 durante el ciclo celular .....	120
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	121
	<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	125
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura M1.</b> Estrategia de análisis: múltiples líneas de evidencia. ....	43
<b>Figura M2.</b> Expresión y purificación de los cromodominios de CHD6.....	47
<b>Figura R1.</b> Silenciamiento específico de CHD6 en células HEK293T.....	54
<b>Figura R2.</b> Análisis de expresión diferencial en células silenciadas para CHD6. ...	56
<b>Figura R3.</b> Análisis de ontología genética.....	63
<b>Figura R4.</b> Motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en los promotores de genes regulados por CHD6. ....	66
<b>Figura R5.</b> Predicción de un nuevo motivo presente en los promotores de <i>down</i> -regulados. ....	71
<b>Figura R6.</b> Validación por PCR a tiempo real de genes diferencialmente expresados en células silenciadas para CHD6. ....	72
<b>Figura R7.</b> Validación de genes regulados por CHD6 con distintos silenciadores.....	74
<b>Figura R8.</b> Posibles formas de <i>splicing</i> alternativo de CHD6 regulan la expresión del gen HPRT1.....	75
<b>Figura R9.</b> CHD6 se une a regiones promotoras y codificantes de los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1. ....	77
<b>Figura R10.</b> El silenciamiento de CHD6 causa una disminución en la proliferación y una acumulación de células en la fase G0/G1.....	80
<b>Figura R11.</b> El silenciamiento de CHD6 causa una ralentización en la progresión de la fase S.....	81
<b>Figura R12.</b> Array de péptidos modificados de histonas.....	83
<b>Figura R13.</b> Expresión de HA-CHD6.....	85
<b>Figura R14.</b> Inmunopurificación de HA-CHD6 endógena.....	86
<b>Figura R15.</b> HA-CHD6 se une a determinadas modificaciones post- traduccionales de histonas. ....	88
<b>Figura R16.</b> HA-CHD6 se une específicamente a modificaciones en residuos de H4 y H3.....	91
<b>Figura R17.</b> Modificaciones adyacentes en H4 y H3 cooperan sinérgicamente en la unión a HA-CHD6. ....	94
<b>Figura R18.</b> HA-CHD6 interacciona con modificaciones combinatorias de H4 y H3. ....	95
<b>Figura R19.</b> His-cromodominios de CHD6 e His-hCLE purificados. ....	97
<b>Figura R20.</b> Los cromodominios de CHD6 se unen a determinadas modificaciones post-traduccionales de histonas. ....	99

<b>Figura R21.</b> Los cromodominios de CHD6 se unen específicamente a modificaciones en residuos de H4 y H2B. ....	101
<b>Figura R22.</b> Modificaciones adyacentes en H4 y H2B cooperan sinérgicamente en la unión a los cromodominios de CHD6. ....	102
<b>Figura R23.</b> Los cromodominios de CHD6 interaccionan con modificaciones combinatorias de H4 y H2B. ....	104
<b>Figura R24.</b> La interacción entre HA-CHD6 y las modificaciones K16ac/K20me2 de H4 se encuentra gobernada por sus cromodominios. .	105
<b>Suplementaria RS1.</b> Detalle de genes regulados que conforman las anotaciones GO enriquecidas de células silenciadas para CHD6. ....	125
<b>Suplementaria RS2.</b> Detalle de las secuencias consenso para los motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en promotores de genes regulados por CHD6. ....	126
<b>Suplementaria RS3.</b> Localización de motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en promotores de genes regulados por CHD6 (z-score>20). ....	129
<b>Suplementaria RS4.</b> Análisis de enriquecimiento de motivos de unión a TFs en los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1. ....	130

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de genes regulados por CHD6 .....	57
<b>Tabla 2.</b> Factores de transcripción regulados por CHD6 .....	65
<b>Tabla 3.</b> Familias de factores de transcripción con motivos enriquecidos en genes regulados por CHD6 .....	70
<b>Tabla 4.</b> Lista de péptidos modificados que interaccionan con HA-CHD6 (IIR>0.2)	89
<b>Tabla 5.</b> Lista de péptidos modificados que interaccionan con los cromodominios de CHD6 (IIR>0.2) .....	100

## ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

<b>A:</b> Amperio	<b>kb:</b> Kilobase
<b>APS:</b> Persulfato de amonio	<b>kDa:</b> Kilodalton
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>L:</b> litro
<b>BSA:</b> Bovin serum albumin	<b>LB:</b> Medio Luria-Bertani
<b>cDNA :</b> DNA complementario	<b>M:</b> Molar
<b>ChIP:</b> Inmunoprecipitación de cromatina	<b>MAPK:</b> <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>CHD:</b> Chromodomain helicase DNA-binding domain	<b>MAPKK:</b> <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>DAPI:</b> 4', 6'-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride	<b>MAPKKK:</b> <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>DBD:</b> Dominio de unión a DNA	<b>MEK:</b> <i>MAPK/ERK kinase</i>
<b>DMEM:</b> <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	<b>min:</b> Minuto
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido	<b>mol:</b> Moles
<b>DNA:</b> Ácido desoxiribonucleico	<b>p/v:</b> Relación peso/volumen
<b>DNAasa:</b> Desoxiribonucleasa	<b>PBS:</b> Solución salina fosfato
<b>dNTPs:</b> Desoxiribonucleótidos trifosfato	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DTT:</b> Ditioneitol	<b>PMSF:</b> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminetetracético	<b>RNA:</b> Ácido ribonucleico
<b>ERK:</b> <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	<b>RNAasa:</b> Ribonucleasa
<b>FBS:</b> <i>Fetal bovine serum</i>	<b>mRNA :</b> RNA mensajero
<b>g:</b> Aceleración gravitatoria terrestre	<b>RT:</b> Transcripción reversa
<b>g:</b> Gramo	<b>RT-qPCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<b>s:</b> Segundos
<b>h:</b> Hora	<b>SDS:</b> <i>Sodium-dodecyl-sulphate</i>
<b>H2A:</b> Histona H2A	<b>SDS-PAGE:</b> Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS
<b>H2B:</b> Histona H2B	<b>siRNA:</b> <i>Short interference RNA</i>
<b>H3:</b> Histona H3	<b>snRNA:</b> <i>Small nuclear RNA</i>
<b>H4:</b> Histona H4	<b>SWI/SNF:</b> <i>Mating type switching/sucrose non fermenting</i>
<b>HAT:</b> Acetiltransferasa de histonas	<b>TBE:</b> Tampón Tris-borato-EDTA
<b>HDAC:</b> Deacetiltransferasa de histonas	<b>TE:</b> Tampón Tris-EDTA
<b>HEPES:</b> (2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid	<b>TEMED:</b> N,N,N',N'-Tetra-metiletilendiamida
<b>HMT:</b> Metiltransferasas de histonas	<b>Tris:</b> <i>Tris (hydroxymethyl)-amino methane</i>
<b>IPTG:</b> Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	<b>Tritón X-100:</b> t-Octilfenoxipoliétoxietanol
<b>ISWI:</b> <i>Imitation switch</i>	<b>Tween 20:</b> Monolaurato de polioxitilensorbitano
<b>JNK:</b> <i>c-Jun N-terminal kinase</i>	
<b>Kan:</b> Kanamicina	

**U:** Unidades

**UV:** Ultravioleta

**V:** Voltios

**v/v:** Relación volumen/volumen

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## SUMMARY

DNA structure contains alterations or modifications that permit or block the access of components of the transcription machinery, and DNA replication, recombination and damage repair, which result in activation or silencing of specific genes. Acetylation and methylation of lysine residues of histone tails are known as the main regulators of chromatin structure.

The CHD6 chromatin remodeler is conserved from yeast to human and contains two chromodomains with binding activity to histone modifications at the N-terminus and a SNF2-like ATPase domain. Its biological function is largely unknown, however it is known that exists in intranuclear sites of mRNA synthesis, that colocalizes with RNA polymerase II and moreover it is ubiquitously expressed, although mostly in the brain.

In order to characterize the CHD6 biological function, HEK293T cells were CHD6-silenced by shRNA and a transcriptome analysis was made, identifying a list of 191 genes both up- and down-regulated primarily involved in processes as cell proliferation, apoptosis and downregulation of transcription. Within these genes there is a large number of transcription factors, which are mostly associated with the cell cycle. These results were validated by qRT-PCR of five genes (NEDD4, GDF15, ITM2C, SIP1 and HPRT1) and different silencers of CHD6. Moreover the presence of CHD6 in NEDD4, GDF15 and HPRT1 genes was confirmed by chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) observing that CHD6 is recruited to both promoter and coding regions.

Analysis of the promoter sequences of CHD6-regulated genes indicate that they are enriched in transcription factors binding sites motifs, which mainly belong to the E2F, EGR and SP1 families. These families of transcription factors have a clear role in cell cycle regulation. A new and uncharacterized motif was identified in at least 65% of down-regulated genes which could represent a new binding motif for transcription factors or a motif involved in the interaction of CHD6 with promoters of down-regulated genes.

Since a large number of CHD6-modulated genes regulate cell proliferation, we evaluated the growth behavior of CHD6-silenced cells by FACS and BrdU pulse-chase assays and observed that CHD6 regulates cell proliferation by promoting DNA synthesis.

The histone modifications recognized by CHD6 and its chromodomains is unknown, therefore we have studied their interaction with numerous combinations of modified histones using an array of commercial peptides representing modified histones. Both CHD6 and its chromodomains mainly bind to acetylated and methylated residues of histone H4, primarily to K16ac and K20me2 marks which are associated with transcriptionally active chromatin and heterochromatin.

Together these data indicate that the CHD6 function as transcriptional regulator would be mediated by its interaction with both, transcription factors of the E2F, EGR and the SP1 families and with K16ac-K20me2 modifications of histone H4. Furthermore the modulation by CHD6 of genes and transcription factors involved in cell proliferation together with its role in the progression of S phase of the cycle suggest an important role of CHD6 in the development of certain diseases, such as cancer.





## RESUMEN

Existen alteraciones o modificaciones en la estructura del ADN que permiten o bloquean el acceso a diversos componentes de la maquinaria de transcripción, replicación, recombinación y reparación del daño al ADN que tienen como resultado la activación o silenciamiento de los genes. La acetilación y metilación de residuos de lisina de las colas de histonas se conocen como el principal mecanismo regulador de la estructura de la cromatina.

La proteína remodeladora de cromatina CHD6, está conservada desde levaduras hasta humano y se caracteriza por tener dos cromodominios que unen modificaciones de histonas en la región N-terminal y un dominio ATPasa SNF2-like. Su función biológica es prácticamente desconocida, no obstante se sabe que se encuentra en sitios intranucleares de síntesis de mRNA, que colocaliza con la RNA polimerasa II y que su expresión es ubicua aunque mayoritaria en cerebro.

Con el objetivo de caracterizar la función biológica de CHD6, en esta tesis se silenciaron células HEK293T para CHD6 mediante shRNA y se hizo un análisis de transcriptoma, identificándose una lista de 191 genes tanto *up*- como *down*-regulados que participan principalmente en procesos de proliferación celular, apoptosis y regulación negativa de la transcripción. Dentro de estos mismos genes, CHD6 parece regular una cantidad importante de factores de transcripción, los cuales en su mayoría se asocian al ciclo celular. Dichos resultados fueron validados mediante qRT-PCR de cinco genes (NEDD4, GDF15, ITM2C, SIP1 y HPRT1) y distintos silenciadores para CHD6. Además se comprobó la presencia de CHD6 en los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1 mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), observando que CHD6 se une tanto a regiones promotoras como codificantes.

El análisis de los promotores de los genes regulados por CHD6 indica que los mismos poseen motivos canónicos enriquecidos de unión a factores de transcripción (*TFBS*), los cuales principalmente pertenecen a las familias E2F, EGR y SP1. Se ha descrito que estas familias de factores de transcripción poseen un papel claro en la regulación del ciclo celular. También se identificó en más del 65% de los genes *down*-regulados un motivo no caracterizado, que podría constituir un nuevo motivo de unión para factores de transcripción o bien un motivo de interacción de CHD6 con los promotores de los genes regulados.

Dada la implicación de CHD6 con genes que regulan la proliferación celular, hemos evaluado el crecimiento de las células CHD6-silenciadas mediante FACS y ensayos de pulso-caza de BrdU, observando así una reducción en la proliferación celular y ralentización para entrar a la fase S en células silenciadas para CHD6.

Por otra parte, puesto que se desconocen las modificaciones de histonas a las que se unen tanto CHD6 como sus cromodominios, en esta tesis se analizó su posible interacción con numerosas combinaciones de histonas modificadas mediante un *array* de péptidos comercial, observando que tanto CHD6 como sus cromodominios se unen a acetilaciones y metilaciones de la histona H4, principalmente K16ac y K20me2 que están asociadas tanto a cromatina transcripcionalmente activa como a heterocromatina.

Todo esto indica que la función de CHD6 como regulador transcripcional, podría estar mediada por su interacción tanto a factores de transcripción de las familias E2F, EGR y SP1 como a las modificaciones K16ac-K20me2 de la histona H4. Además la modulación por CHD6 de genes y factores de transcripción involucrados en la regulación del ciclo celular junto con su papel en la progresión de la fase S del ciclo, parece indicar su importancia en el desarrollo de ciertas enfermedades, como el cáncer.



## INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### I. LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

#### I.1 La estructura y organización de la cromatina

El genoma eucariota se encuentra empaquetado dentro del núcleo celular en forma de cromatina, una estructura altamente organizada que tiene como unidad fundamental el nucleosoma. Estos nucleosomas se encuentran organizados en cadenas lineales a lo largo del DNA, en forma de collar de cuentas o rosario siendo cada cuenta o unidad repetida lo que se define como nucleosoma. Esta estructura puede compactarse en estructuras de orden superior, como la fibra de 30 nm que es transcripcionalmente inactiva, pero que puede desorganizarse, en función de las necesidades de la célula (Luger and Hansen, 2005). A su vez, estas fibras se empaquetan en estructuras de orden superior hasta formar los cromosomas, altamente compactados durante la mitosis. Los nucleosomas están formados por un fragmento de DNA de 147 pb, enrollado 1,65 veces a un octámero de histonas, estableciéndose 14 contactos entre ellos (Luger et al., 1997). Cada octámero está compuesto a su vez por dos copias de cada una de las cuatro histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Cada histona posee una cola N-terminal de 16 a 44 residuos de longitud, que junto con los dominios globulares pueden ser post-traduccionalmente modificados en residuos específicos, conduciendo a cambios en la estructura de la cromatina a través de interacciones directas con elementos del nucleosoma y de la maquinaria nuclear (Kouzarides, 2007a). Las histonas H2A y H3 pueden ser reemplazadas por las variantes de histonas H2A.Z y H3.3. H2A.Z ha sido relacionada tanto con activación como con la represión de la expresión génica, mientras que H3.3 se deposita únicamente en regiones transcripcionalmente activas (Kamakaka and Biggins, 2005, Sarma and Reinberg, 2005).

La cromatina puede presentarse en dos estados diferentes: eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se encuentra diseminada por todo el núcleo y representa la forma activa de la cromatina, en la que se está transcribiendo el material genético y por lo tanto donde se encuentran la mayoría de los genes activos. Por otro lado, la heterocromatina es la forma inactiva condensada, localizada sobre toda en la periferia del núcleo. En estas regiones, los nucleosomas se encuentran unidos a proteínas adicionales produciendo el silenciamiento de los genes.

La importancia de los nucleosomas en la regulación génica pasó desapercibida hasta que se demostró que su presencia inhibe el inicio de la transcripción *in vitro* (Lorch et al., 1987), indicando que los nucleosomas en la regulación génica actuaban como una barrera física para la transcripción. La eliminación de histonas en *S. cerevisiae* conduce a un

incremento global en la transcripción, proporcionando evidencia *in vivo* de que los nucleosomas pueden reprimir este proceso (Han and Grunstein, 1988) (Wyrick et al., 1999). El estudio de la distribución de los nucleosomas ha permitido conocer cómo la localización de los mismos a lo largo de los genes afecta el posicionamiento de la maquinaria transcripcional en los promotores en el inicio de la transcripción y su progresión durante la elongación. Por ejemplo, estudios realizados en el gen PHO5 han demostrado que los nucleosomas pueden regular la transcripción por la oclusión de la caja TATA y de las regiones UAS (*Upstream Activating Sequence*) y que el desplazamiento de dicho nucleosoma es crítico para la activación transcripcional (Lohr, 1997, Martinez-Campa et al., 2004). Por tanto, además de su función estructural como una forma conveniente de almacenar grandes cantidades de DNA dentro del núcleo celular, la cromatina tiene un papel esencial en la regulación de la transcripción.

Durante los últimos años, se han llevado a cabo un elevado número de estudios genómicos dirigidos hacia la localización de nucleosomas a lo largo del genoma completo de algunos organismos, principalmente de la levadura (Field et al., 2008, Jiang and Pugh, 2009, Whitehouse et al., 2007, Shivaswamy and Iyer, 2008, Segal et al., 2006, Lee et al., 2007, Mavrich et al., 2008, Schones et al., 2008, Valouev et al., 2008, Yuan et al., 2005). Estos ensayos han proporcionado una imagen global de la estructura de la cromatina. En primer lugar, hay que destacar que las regiones promotoras poseen un menor número de nucleosomas que las regiones codificantes (Bernstein et al., 2004, Lee et al., 2004, Sekinger et al., 2005). Además los nucleosomas en levaduras están altamente organizados, encontrándose un 80% posicionados, es decir, en la misma localización en todas las células dentro de una misma población (Lee et al., 2007, Yuan et al., 2005). Estos estudios también han definido la arquitectura general de “genes típicos”, que se caracterizan por poseer una serie de propiedades comunes. En primer lugar, presentan regiones libres de nucleosomas o NFR (*Nucleosome-Free Region*) cuya amplitud es de 150-170 pb aproximadamente (Albert et al., 2007, Kaplan et al., 2009, Mavrich et al., 2008, Whitehouse et al., 2007, Yuan et al., 2005). Estos NFRs se encuentran *upstream* del sitio de inicio de la transcripción o TSS (*Transcription Start Site*) y también en el extremo 3' de la región codificante. En segundo lugar, el primer nucleosoma *downstream* del TSS, denominado nucleosoma +1, está localizado, y los nucleosomas en el extremo 5' del gen están generalmente más localizados que los que se encuentran en medio de éste. Por último, el primer nucleosoma *upstream* del NFR está también bien posicionado y se denomina nucleosoma -1. El centro del nucleosoma +1 está localizado a ~50-60 pb *downstream* del TSS, por lo que la transcripción comienza típicamente sobre unas 10 pb dentro del primer nucleosoma (Mavrich et al., 2008, Whitehouse et al., 2007, Yuan et al., 2005).

En base a estas características, los promotores se pueden diferenciar en dos categorías: abiertos y cerrados; que definen a su vez dos tipos de genes, constitutivos por un lado, y altamente regulados por otro.

- *Genes constitutivos, con promotores abiertos:* Estos promotores poseen la estructura definida anteriormente para un “gen típico” (nucleosoma -1/NFR/nucleosoma +1). La variante de la histona H2A.Z se encuentra enriquecida en los nucleosomas -1 y +1 de estos genes, pudiendo facilitar la pérdida del nucleosoma y la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC). En estos casos, los sitios de unión para activadores transcripcionales TFBS (*Transcription Factor Binding Sites*) residen generalmente dentro de las regiones libres de los nucleosomas (Struhl, 1985), facilitando así su unión y la activación de la transcripción.

- *Genes regulados, con promotores cerrados:* en este caso los genes regulados poseen una región libre de nucleosomas menor, debido normalmente a la deslocalización de los nucleosomas que cubren el promotor (Albert et al., 2007, Field et al., 2008, Tirosh and Barkai, 2008). Presentan en su estado reprimido nucleosomas cubriendo el TSS, las regiones adyacentes al TSS y la mayoría de los sitios de unión a factores de transcripción. En estos promotores, los nucleosomas compiten con los factores de transcripción por sus sitios de unión, por lo que la acción de complejos remodeladores de cromatina y modificadores de histonas es necesaria para “abrir” la cromatina, facilitando así el acceso a los TFBS y la transcripción. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones, al menos uno de los sitios de unión a factores de transcripción permanece expuesto o parcialmente expuesto en el borde del nucleosoma (Struhl, 1985), permitiendo así el acceso de una primera molécula al promotor. Tras esta unión inicial, sería necesaria la acción de los remodeladores y modificadores de cromatina para la entrada de nuevas moléculas al resto de los sitios de unión ocultos inicialmente (Becker and Horz, 2002). Este proceso es conocido como “modelo de activación en dos pasos”. El gen PHO5, es un claro ejemplo de promotor cubierto, que posee un sitio expuesto para la unión del activador Pho4, localizado entre dos nucleosomas (Almer et al., 1986, Fascher et al., 1990).

Los genes constitutivos difieren de los altamente regulados en otras características relacionadas con el inicio de la transcripción. La caja TATA está presente en el núcleo del promotor, típicamente a unos 30-60 pb del TSS, siendo su secuencia consenso TATA(A/T)A(A(A/T)(A/G) (Basehoar et al., 2004). Análisis filogenéticos de seis especies de *Saccharomyces* revelaron que sólo un 20% de los 5700 genes de levadura contiene caja TATA (Basehoar et al., 2004). Este elemento, predomina en promotores cubiertos más que en los abiertos, y en genes altamente regulados, más que en genes constitutivos (Basehoar

et al., 2004, Huisinga and Pugh, 2004). El posible bloqueo de este elemento justificaría la necesidad de complejos remodeladores de cromatina en estos promotores para la activación de la transcripción. Aunque no todos los promotores presenten caja TATA, todos los genes regulados por la RNAPII requieren la actuación de la proteína TBP (*TATA Binding Protein*) para el inicio de la transcripción (Kuras and Struhl, 1999, Li et al., 1999).

Los nucleosomas no se encuentran dispersos a lo largo de los promotores de forma aleatoria, sino que existen factores que determinan su posición en el genoma. Entre estos factores destacan en primer lugar la propia secuencia del DNA. Secuencias poly (dA/dT) son más resistentes al enrollamiento y por tanto interfieren con la formación y estabilidad del nucleosoma (Segal and Widom, 2009). Por otro lado, repeticiones del dinucleótido AA/TT cada 10 pb proporcionan una curvatura favorable para la formación del nucleosoma (Segal et al., 2006, Lowary and Widom, 1998, Ioshikhes et al., 2006). Sin embargo, son las secuencias poly (dA/dT) las más aceptadas como determinantes de la posición de los nucleosomas (Segal and Widom, 2009, Mavrich et al., 2008, Yuan et al., 2005, Anderson and Widom, 2001, Iyer and Struhl, 1995). Por otro lado, el posicionamiento de los nucleosomas puede ser consecuencia de la actividad reguladora de los complejos remodeladores de cromatina (Cairns, 2005), de los factores de transcripción (Shim et al., 1998, Taylor et al., 1991, Varga-Weisz and Becker, 1995) y de la RNAPII (Field et al., 2008, Mavrich et al., 2008, Schones et al., 2008, Yuan et al., 2005). Por ejemplo, es imposible reconstituir *in vitro* el promotor del gen PHO5 utilizando sólo histonas y DNA, ya que es necesaria la presencia de una actividad ATP-dependiente para recrear el estado de la cromatina *in vivo* (Korber and Horz, 2004).

### **I.2 El proceso de transcripción**

La RNA polimerasa (RNAP) es la enzima encargada de llevar a cabo la transcripción, uno de los procesos celulares que controla más directamente la expresión génica. A diferencia de los organismos procariotas que solo tienen una RNAP, los eucariotas presentan tres, RNA Polimerasas I, II y III, que se encargan de sintetizar diferentes tipos de RNAs. La RNAP I es la responsable de la síntesis de una parte del RNA ribosómico, la RNAP III se encarga de transcribir RNAs de pequeño tamaño como el RNA de transferencia, mientras que la RNAP II es la encargada de transcribir el RNA mensajero (mRNA) que codifica proteínas y también sintetiza otros RNAs no codificantes. El proceso de transcripción llevado a cabo por la RNAP II se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El inicio de la transcripción en eucariotas es un proceso altamente regulado en el que participan un gran número de proteínas, desde factores de transcripción que se unen de forma específica al DNA, hasta complejos remodeladores y modificadores de cromatina que alteran esta



estructura, controlando la unión de estos mismos activadores y permitiendo a continuación la unión de los componentes de la maquinaria general de la transcripción y la RNAP II (Struhl, 1998, Pugh, 2000, Orphanides and Reinberg, 2002, Li et al., 2007). El comienzo de la transcripción comienza con la unión de los activadores transcripcionales a secuencias específicas de DNA en respuesta a señales celulares. Estos reclutan coactivadores transcripcionales como los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y los complejos modificadores de histonas, que producen una relajación de la estructura de la cromatina, permitiendo a continuación la entrada de los factores generales de la transcripción (GTFs) y la RNAP II para la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción. Es importante destacar que la organización del genoma en nucleosomas es capaz de afectar todas las etapas de la transcripción, desde la unión del activador transcripcional, hasta la formación del PIC y también pasos posteriores como la elongación (revisado en (Workman and Kingston, 1998).

### **I.3 Maquinaria general de la transcripción**

Junto con los factores de transcripción mencionados anteriormente, la célula precisa de una maquinaria general de la transcripción, formada por la RNAPII, los factores generales de la transcripción (GTFs) y el complejo coactivador *Mediator* que conecta a los activadores con la RNAPII y los GTFs.

Los factores generales de la transcripción: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, se encuentran evolutivamente muy conservados, y han sido definidos como el mínimo conjunto de proteínas auxiliares necesarias y suficientes para iniciar la transcripción *in vitro* desde un promotor mínimo. A diferencia de los reguladores transcripcionales, que se unen específicamente a secuencias del DNA y que son dirigidos a un discreto grupo de genes, los GTFs, como su nombre indica, son ampliamente utilizados por la célula y tienen baja especificidad de unión. Estos componentes de la maquinaria basal de transcripción funcionan en la mayoría de genes ayudando a la unión y liberación de la RNAPII en el TSS (revisado en (Thomas and Chiang, 2006).

TFIID es un complejo multiproteico que contiene la proteína de unión a la caja TATA o TBP y los factores asociados a la proteína TBP o TAFs (*TBP-Associated Factors*). La proteína TBP también puede formar parte del complejo de acetilación de histonas SAGA (Grant et al., 1997, Mizzen et al., 1996, Nishikawa et al., 1997). Como ya se ha comentado, la unión de la proteína TBP es dirigida a los promotores que presentan caja TATA (aproximadamente un 10% del total) formando parte del complejo modificador de histonas SAGA (Sermwittayawong and Tan, 2006, Huisinga and Pugh, 2004), mientras que en el caso de los genes que carecen de caja TATA, la unión de TBP con los promotores está

estabilizada a través del complejo TFIID, posiblemente mediante la acción de los TAFs (Basehoar et al., 2004, Huisinga and Pugh, 2004, Pugh and Tjian, 1991).

Tras la unión de TBP a la caja TATA, se produce el reclutamiento de los factores TFIIA y TFIIB, que estabilizan las interacciones TBP-DNA (posiblemente en cooperación con otros GTFs y factores reguladores) y promueven la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción o PIC. De esta manera, se une a continuación el complejo formado por TFIIF y la RNAP II, colocando la polimerasa sobre el TSS. Sin embargo, es necesario que se unan dos factores más, TFIIIE y TFIIH antes de que se separe la hélice de DNA y se exponga el DNA molde. Los complejos TFIIIE y TFIIH trabajan de manera coordinada modulando la actividad de la RNAP II y facilitando la liberación del promotor en el inicio de la transcripción. TFIIIE se asocia después de la RNAP II pero antes que TFIIH (Buratowski et al., 1989), reclutando junto con el complejo *Mediator* al factor TFIIH, a través de interacciones directas (Esnault et al., 2008). Sin embargo, TFIIIE puede también asociarse con un PIC parcial en ausencia de RNAP II (Yokomori et al., 1998). La unión de TFIIH completa la formación del complejo de pre-iniciación. La actividad helicasa de una de las subunidades TFIIH, utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para la separación de las cadenas del DNA, permitiendo por tanto la formación de un complejo abierto con la RNAP II (Wang et al., 1992). La quinasa Kin28, subunidad del TFIIH, promueve el proceso de transición, desde la iniciación de la transcripción hacia la elongación a través de la fosforilación de la serina en posición 5 del motivo repetido YSPTSPS del dominio CTD (*Carboxy-Terminal Domain*) de la RNAP II (Komarnitsky et al., 2000, Valay et al., 1995). Esta marca induce el reclutamiento, por parte de la polimerasa, de un gran número de factores, incluyendo enzimas de “*capping*” de mRNA, el complejo Nrd-Nab3 y el complejo PAF (*Polymerase II-Associated Factor*) (Komarnitsky et al., 2000, Hampsey and Reinberg, 2003, Ng et al., 2003, Vasiljeva et al., 2008). Las enzimas de *capping* introducen una estructura 7-metil guanina (“*cap*”) en el extremo 5' del transcrito nascente para protegerlo de la degradación y marcarlo para el transporte al citoplasma donde será traducido finalmente. El complejo Nrd-Nab3 promueve la terminación de los transcritos alterados y que por tanto codifican regiones no funcionales y los dirige a la ruta del exosoma nuclear para su degradación. Y por último, el complejo PAF conecta la fosforilación de esta serina con una red de modificaciones de histonas.

### **I.4 Factores de transcripción**

Los activadores transcripcionales son proteínas reguladoras de la transcripción que presentan dos dominios: un dominio de unión a DNA (DBD), responsable de la unión a las zonas reguladoras del promotor en secuencias específicas (TFBS) para cada factor de transcripción y un dominio de activación (AD), que contacta con las proteínas remodeladoras

y/o modificadores de cromatina o coactivadores, mediando el inicio de la transcripción (Kadonaga, 2004). Mientras que los dominios de unión a DNA se encuentran muy bien caracterizados, tanto funcional como estructuralmente, los dominios de activación no comparten motivos o estructuras fácilmente reconocibles (Triezenberg, 1995). Así, mientras que más de 50 patrones para los DBD han sido documentados en las bases de datos, ningún patrón específico o motivo para la identificación de AD ha sido definido (Hulo et al., 2004). La actividad y localización celular de estos factores de transcripción está controlado por señales intra- y extracelulares, normalmente mediante su activación por fosforilación. En todos los casos conocidos, los activadores transcripcionales reclutan proteínas adicionales o complejos proteicos hacia promotores específicos, conduciendo a la unión de una de las tres RNA polimerasas y, si ello fuera necesario, a remodeladores de la cromatina (Ptashne and Gann, 1997, Utley et al., 1998).

## II. MODIFICACIÓN DE LA CROMATINA Y REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

El concepto de que cambios en la estructura de la cromatina afectan la expresión de los genes es relativamente nuevo. El campo de la epigenética en los últimos 30 años, ha mejorado enormemente nuestro entendimiento sobre la regulación génica y ha ampliado nuestro punto de vista de la regulación transcripcional de un simple mecanismo de “encendido/apagado” a algo más complejo y dinámico (resivado en (Holliday, 2006). La epigenética está definida como los cambios en la expresión génica no hereditarios que no están asociados a cambios en la propia secuencia del DNA. Estos cambios epigenéticos incluyen la metilación del DNA, la modificación pos-traducciona de histonas o PTMs (*Post-Translational Modifications*), la expresión de RNAs no codificantes y la propia arquitectura nuclear (de la Serna et al., 2006). Los mecanismos primarios por los que se regulan los genes, modificando la estructura de la cromatina son la metilación del DNA por enzimas metiltransferasas (*DNMTs*) y la modificación de proteínas del nucleosoma por remodeladores de cromatina. Éstos últimos se dividen a su vez en dos clases; (i) aquellos que modifican covalentemente las histonas y (ii) aquellos que utilizan ATP para alterar las interacciones entre el DNA y las histonas. Mutaciones en miembros de estas tres clases de enzimas están asociadas con enfermedades en humanos, y en ratón con muerte embrionaria (Bultman et al., 2000, Bultman et al., 2005, Guidi et al., 2001, Kim et al., 2001, Stopka and Skoultchi, 2003).

### II.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA en mamíferos está limitada básicamente al carbono 5 de las citosinas encontradas en los dinucleótidos citosina-guanina (CpG). Los dinucleótidos CpG están

presentes en los genomas en baja frecuencia comparada con la predicha para C/G, y se encuentran solamente en altas concentraciones en regiones de DNA que abarcan 200-500pb llamadas “islas CpG” (Takai and Jones, 2002, Gardiner-Garden and Frommer, 1987). La mayoría de los genes (72%) contienen islas CpG en su promotor (Saxonov et al., 2006) el cual se encuentra típicamente hipo-metilado durante todo el desarrollo (Shen et al., 2007) e incluye a muchos genes *housekeeping* que se expresan ubicuamente y genes altamente regulados durante el desarrollo (Meissner et al., 2008). El 28% de genes restantes, que no contienen islas CpG, son básicamente genes de expresión específica de tejido (Meissner et al., 2008, Saxonov et al., 2006). Mientras la correlación entre metilación y represión génica por islas CpG ha sido muy documentada, el papel de la metilación en la regulación de genes que no contienen islas CpG es confuso (Shen et al., 2006, Reiner, 2005, Weber et al., 2007). La pérdida de metilación en embriones de ratón es letal (Li et al., 1992, Okano et al., 1999) mientras que la falta de regulación en la metilación se encuentra comúnmente en cáncer, desde la hiper-metilación de genes supresores tumorales y la hipo-metilación de oncogenes y genes asociados a metástasis (Gopalakrishnan et al., 2008).

### **II.2 Modificaciones post-traduccionales de histonas**

Como se ha mencionado antes, la célula utiliza enzimas modificadoras de cromatina, que suelen formar parte de grandes complejos proteicos. Dichos complejos alteran el estado de la cromatina mediante la incorporación o eliminación de modificaciones post-traduccionales o PTMs (*Post-Translational-Modifications*) tales como grupos acetilos, fosfatos o metilos a través de enlaces covalente. También se han descrito otras modificaciones como la ubiquitinación, sumoilación y la ADP-ribosilación. La mayoría de estas reacciones se producen en los extremos N-terminal de las colas de histonas, a excepción de la ubiquitinación, que ocurre en los extremos C-terminales de H2A y H2B. Adicionalmente, también se producen modificaciones en los dominios globulares de las histonas (Kouzarides, 2007a).

La modificación de histonas da lugar a diferentes efectos. A excepción de la metilación, la modificación de histonas produce cambios en la carga neta de los nucleosomas, que debilitan las interacciones establecidas entre el DNA y las histonas, disminuyendo la estabilidad del nucleosoma y alterando la interacción entre nucleosomas. Algunas modificaciones influyen directamente en estructuras de orden superior de la cromatina, como por ejemplo la acetilación en la lisina 16 de la histona 4, H4K16, que inhibe la formación de la fibra compacta de 30 nm (Shogren-Knaak et al., 2006). Asimismo, la modificación de histonas puede generar sitios de reconocimiento por otras proteínas (revisado en (Seet et al., 2006). En la tabla (X) se resumen las modificaciones de histonas

más relevantes, las enzimas que las producen, los dominios que interaccionan con las histonas modificadas y sus posteriores efectos en transcripción.

Generalmente, la modificación covalente de las histonas no ocurre de forma aislada. De hecho, una modificación puede depender de otra, dentro de la misma o en una histona adyacente. Por ejemplo, la fosforilación de la Ser10 en H3 estimula la acetilación de la Lys14 de la misma cola de histona por la histona acetil-transferasa Gcn5 (Lo et al., 2000). Por tanto se ha propuesto que modificaciones individuales o patrones de modificaciones de histonas forman un “código de histonas” que puede ser “leído” por otras proteínas que influyen en la dinámica de la cromatina y en su función (Jenuwein and Allis, 2001, Strahl and Allis, 2000, Turner, 2000).

### ***II.2.1 La acetilación como marca de activación transcripcional***

Las histonas pueden ser acetiladas en residuos específicos de lisina de H3 (H3K9, 14, 18, 23) y H4 (K5, K8, K12, K16, K20), así como también de H2A (K5, 9) y H2B (5, 12, 15, 20)(Kouzarides, 2007b). Desde la primera observación de acetilación de histonas (Phillips, 1963), esta modificación ha sido estudiada ampliamente. La asociación de histonas acetiladas con cromatina transcripcionalmente activa fue propuesta poco después de la identificación de esta modificación por Allfrey (Allfrey et al., 1964) y años más tarde ya estaba muy documentada (Madisen et al., 1998, Grunstein, 1997, Struhl, 1998). La acetilación de histonas provoca una disminución de la carga positiva neta de la cola N-terminal, resultando en una estructura de la cromatina menos condensada y un incremento en la accesibilidad al DNA de factores regulatorios. Muchos activadores transcripcionales poseen una actividad intrínseca de histona-acetiltransferasa (Brownell and Allis, 1996, Struhl, 1998). Esta modificación es un proceso reversible, posible mediante deacetilación mediada por histonas-deacetilasas, un proceso que generalmente es requerido para el silenciamiento transcripcional (Grunstein, 1997, Spencer and Davie, 1999).

De acuerdo con esto, los dominios heterocromáticos transcripcionalmente silenciados se encuentran generalmente menos acetilados que la eucromatina. Así por ejemplo, en telómeros de levadura, la hipoacetilación de histonas y el ensamblaje de heterocromatina es un proceso gradual mediado por el complejo de proteínas Sir (*Sir-proteins*) (Grunstein, 1998, Moazed, 2001). En mamíferos, la inactivación del cromosoma X se encuentra como heterocromatina facultativa y está extensamente libre de histonas acetiladas (Jeppesen and Turner, 1993). Sin embargo, existen fracciones de heterocromatina que contienen formas específicas de histonas acetiladas, así por ejemplo en *Drosophila*, la heterocromatina se encuentra enriquecida en acetilación de H4K12 (Turner et al., 1992). Los organizadores nucleares o NORs (*Nucleolar Organizers*) de *Drosophila* y mamíferos generalmente no

contienen grandes cantidades de histonas acetiladas, mientras que en plantas, los NORs constituyen las regiones más intensamente acetiladas de los cromosomas mitóticos (Belyaev et al., 1997). A pesar del hecho de que la transcripción se encuentra disminuida durante la mitosis, una intensa acetilación es mantenida en regiones eucromáticas de cromosomas mitóticos, de acuerdo con ello la acetilación de histonas en eucromatina durante la mitosis, se ha sugerido representa una marca epigenética de regiones potenciales transcripcionalmente activas que se transmiten a la célula hija (Jeppesen, 1997).

Durante la replicación, la histona H4 diacetilada (en K5 y K12), es incorporada en los nucleosomas recién formados, en *Drosophila* y humano (Sobel et al., 1995). Este fenómeno puede ser también observado a nivel de extensos dominios de cromatina. En mamíferos, la heterocromatina se convierte en una forma altamente acetilada durante la replicación, y en una forma deacetilada durante la mitosis (Taddei et al., 1999).

La estructura relajada de la cromatina por la acetilación de histonas y subsecuente accesibilidad a factores regulatorios, se ha visto correlacionada tanto con procesos de recombinación como de reparación del DNA (McBlane and Boyes, 2000, McMurry and Krangel, 2000, Ikura et al., 2000, Bird et al., 2002).

### **II.2.2 La metilación como marca de represión transcripcional**

La metilación puede ocurrir en diferentes residuos, tales como lisina, arginina e histidina. La metilación de lisinas y argininas ha sido extensamente estudiada y se ha implicado en múltiples procesos celulares (Kouzarides, 2007a). Actualmente, la metilación de histonas es la modificación más compleja, puesto que su función biológica depende del sitio preciso y del grado de modificación. Los residuos de lisina pueden ser mono-, di- o tri-metilados, mientras que las argininas puede ser mono- o di-metiladas; además de esto, las argininas pueden ser simétrica- o asimétricamente metiladas.

El sitio y estado específico de la metilación de lisinas en las histonas, es catalizado por un grupo de enzimas lisina-metiltransferasas (KMT) que contienen el dominio evolutivamente conservado SET [*Su(var)*, *Enhancer of zeste*, *Tritorax*]. Este grupo se divide a su vez en siete familias: SUV39, SET1, SET2, EZ, RIZ, SMYD y SUV4-20 (Dillon et al., 2005). Adicionalmente se han incluido otros miembros que no pertenecen a ninguna de las subfamilias anteriores: SET7/9 y SET8 (también conocido como PRSET7). Las proteínas que pertenecen a la misma familia comparten una elevada similitud en el dominio SET, así como en la secuencias flanqueantes (Dillon et al., 2005). Hasta la única enzima KMT que carece de dominio SET identificada es Dot1, que metila específicamente K79 de la región globular de H3 (Min et al., 2003, Feng et al., 2002).

Hasta el momento, se han descrito funcionalmente cinco residuos susceptibles de metilación en la región N-terminal de las histonas H3 y H4 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 y H4K20) y dos residuos en el dominio globular de H3 (H3K64 y H3K79). Además de esto, la histona enlazadora H1, puede ser metilada en H1.4K26. En general las metilaciones H3K9, H3K27, H3K64, H4K20 y H1.4K26 se han implicado en el silenciamiento transcripcional (Hublitz et al., 2009), mientras que las metilaciones en H3K4, H3K36 y H3K79 se han asociado con regiones transcripcionalmente activas (Hublitz et al., 2009). No obstante, se ha visto que dependiendo de la localización genómica, una misma metilación puede tener diferentes resultados.

La metilación de H3K9 está involucrada tanto con el silenciamiento génico en eucromatina, como con la formación de heterocromatina (Nielsen et al., 2001, Peters et al., 2002). Por otro lado la metilación de H3K27 juega un papel importante en la represión de los genes HOX durante el desarrollo, así como en la inactivación del cromosoma X y la impronta genética (Plath et al., 2003, Cao et al., 2008). Más recientemente H3K64me3 se ha encontrado enriquecido en heterocromatina pericéntrica y se ha visto asociada con secuencias repetidas y regiones genómicas transcripcionalmente inactivas (Daujat et al., 2009).

En el caso de H4K20, cada estado de metilación se ha implicado en diferentes procesos biológicos. Se han asociado picos de H4K20me1 durante la fase M, con la progresión del ciclo celular y con la condensación de los cromosomas (Huen et al., 2008, Pesavento et al., 2008, Yang and Mizzen, 2009). Fuera de la fase de mitosis, H4K20me1 constituye una marca de transcripción activa (Vakoc et al., 2006). H4K20me2 tiene un papel en la reparación del DNA (Botuyan et al., 2006) y H4K20me3 se encuentra enriquecido en heterocromatina y está implicado en el mantenimiento de la heterocromatina y la estabilidad de los telómeros (Wang and Jia, 2009, Schotta et al., 2004).

En mamíferos, la metilación de H3K4 ocurre en distintas distribuciones genómicas. Se encuentran elevados enriquecimientos de H3K4me3 en los sitios de inicio de la transcripción (TSS) de genes activos, mientras que H3K4me2 se encuentra presente a lo largo de la región codificante de los genes, ambas marcas contribuyen al proceso de iniciación transcripcional y al procesamiento del mRNA respectivamente (Vakoc et al., 2006, Santos-Rosa et al., 2003). Por otro lado se han descrito, tanto en mamíferos como en levadura, picos de H3K4me1 en la región terminal 3' de genes activos (Morillon et al., 2005, Rando and Chang, 2009). La metilación dirigida de H3K4 en estas regiones ocurre vía interacción de KMTs específicas de H3K4 con la forma activa fosforilada de la RNAPII, proporcionando un vínculo directo con la transcripción (Krogan et al., 2003). Es interesante destacar que

largas regiones de metilación de H3K4 cubriendo tanto la región génica como la intergénica son muy evidentes en loci específicos, como en el grupo (*cluster*) de los genes HOX. Un análisis profundo de los loci HOXA y HOXB, identificados en estas regiones, muestran múltiples promotores que generan RNAs no codificantes (Bernstein et al., 2005). Estos transcritos intergénicos han mostrado potenciar la accesibilidad génica (Bolland 2004; Gribanau 2000) y en el caso del *cluster* HOX estos pueden contribuir a su patrón altamente controlado de expresión durante la diferenciación.

La metilación de H3K36 está acoplada al proceso activo de elongación transcripcional y se encuentra enriquecida en la región terminal 3' de los genes diana (Bannister et al., 2005, Kizer et al., 2005, Pokholok et al., 2005, Rao et al., 2005, Barski et al., 2007, Mikkelsen et al., 2007). Sin embargo cuando dicha metilación está presente en la región codificante, previene de una iniciación transcripcional inapropiada de secuencias intragénicas (Lee and Shilatifard, 2007).

En la actualidad, la función de la metilación de H3K79 en la transcripción es de alguna manera contradictoria. En moscas y mamíferos la metilación de H3K79 se ha sugerido actúa como una marca de activación transcripcional (Schubeler et al., 2004). Sin embargo, de forma paralela en otro estudio Barski (Barski et al., 2007) ha demostrado mediante secuenciación masiva que H3K79me1 está enriquecida en genes activos, mientras que H3K79 está presente en genes transcripcionalmente reprimidos en células humanas.

Modificaciones de la histona H2A y H2B han sido escasamente estudiadas (Wyrick and Parra, 2009). Sin embargo, se ha descrito que deleciones de la cola N-terminal de H2A y H2B en levadura, afectan la expresión de un gran número de genes y por lo tanto tienen un papel esencial en la regulación genética. Estudios recientes de secuenciación del genoma humano por Solexa, han mapeado la metilación de H2BK5 en genes activos, sugiriendo un posible vínculo con la transcripción activa (Wyrick and Parra, 2009).

Además de las histonas *core* del nucleosoma, la histona “enlazadora” H1 es metilada en H1.4K26. Esta marca ha sido implicada en la formación de heterocromatina y en la represión transcripcional por Ezh2 (Daujat et al., 2005, Kuzmichev et al., 2004).

### **II.2.3 La metilación de argininas**

Mientras que la metilación en residuos de lisina ha sido globalmente mapeada en múltiples organismos, actualmente sabemos muy poco acerca de la distribución y funciones de la metilación de argininas. La metilación de arginina es catalizada por una familia de enzimas



metiltransferasas llamadas PRMTs [*Protein R(Arg)-Methyltransferases*]. Todos los miembros de esta familia son capaces de monometilar argininas, pero de acuerdo al tipo de dimetilación que realizan se pueden dividir en dos clases: (i) tipo I (PRMT1, 3, 4, 6 y 8) que dimetilan argininas asimétricamente y (ii) tipo II (PRMT5, 7 y 9) que dimetilan argininas simétricamente (Wysocka et al., 2006). Los miembros de la familia PRMT se expresan ubicuamente y están evolutivamente conservados desde levadura hasta humano. Actualmente, se ha identificado en mamíferos 11 PRMTs, todas ellas comparten un dominio catalítico conservado, pero difieren en la localización celular, así como en la especificidad de su sustrato. La actividad enzimática de PRMT2, PRMT10 y PRMT11 no ha sido demostrada todavía (Litt et al., 2009). Se ha propuesto que la modulación de las actividades enzimáticas y la especificidad en determinados loci, es a través de la interacción de las PRMTs con distintos cofactores (Litt et al., 2009).

H3R2, H3R8, H3R17, H3R26, H4R3, H2AR3 son dianas conocidas de PRMTs *in vivo* (Litt et al., 2009). Al igual que los distintos estados de metilación de las lisinas, la metilación simétrica o asimétrica en el mismo residuo, puede marcar regiones de cromatina distintas. Sin embargo, en contraste con la metilación de lisinas, el papel funcional de la metilación de argininas en la estructura de la cromatina y la transcripción no ha sido todavía explorado. Por otra parte, los niveles generales de arginina metilada parecen ser bajos en comparación con la metilación de lisina, indicando una función más restringida en la regulación génica, más que una función general estructural en la formación de la cromatina.

La metilación asimétrica de H4R3me2 por PRMT1 actúa como una marca de activación transcripcional para varios genes regulados por respuesta a estrógeno (Wagner et al., 2006, Barrero and Malik, 2006) y es esencial *in vivo* para el establecimiento y mantenimiento de los dominios de cromatina abierta, marcados por acetilaciones en H3 y H4 (Huang et al., 2005). Sin embargo, cuando la dimetilación es simétrica por PRMT5, H4R3Me2 está en cambio involucrada en silenciamiento transcripcional, como era de esperarse, puesto que PRMT5 es una subunidad del complejo represivo deacetilasa de histona MB2/NURD (Le Guezennec et al., 2006). En el caso del silenciamiento transcripcional del locus de  $\beta$ -globina por PRMT5 es llevado a cabo vía reclutamiento de DNMT3A y de la metilación subsecuente del DNA de la región promotora (Zhao et al., 2009). De acuerdo con la conexión potencial entre la metilación de argininas y la metilación de DNA, H3R8me2 y H4R3me2 se ha visto que regulan la actividad promotora del rDNA de una forma dependiente de metilación del DNA (Majumder et al., 2010). A diferencia de otras metilaciones simétricas de arginina, la dimetilación en H3R8me2 catalizada por PRMT5 puede actuar como una marca de activación por cooperación con el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF en la regulación de genes involucrados con la diferenciación

miogénica (Dacwag et al., 2007). Por otra parte, el nivel de H2A/H4R3me2 (otra diana de PRMT5) es modulada dinámicamente durante la reprogramación epigenética de células germinales primordiales (PGCs), señalando una función importante de esta modificación en la línea celular germinal de ratón (Ancelin et al., 2006).

H3R17me2 y H326Me2 son metiladas por PRMT4 (también conocido como CARM1) y están implicadas en la activación transcripcional mediada por el receptor nuclear (NR) y en la regulación de genes pluripotentes durante el desarrollo temprano de ratón (Koh et al., 2001, Torres-Padilla et al., 2007).

La metilación de H3R2me2 es catalizada por PRMT6. Esta modificación se encuentra enriquecida en heterocromatina y eucromatina silenciada, y ausente en la región TSS de promotores activos, por lo tanto actúa como una marca de represión transcripcional (Guccione et al., 2007, Hyllus et al., 2007). H3R2me2, también puede ser diana de CARM1 aunque en menor medida y coopera con la acetilación de histonas en la activación de genes regulados por NR (Koh et al., 2001).

Al igual que otras modificaciones involucradas en procesos regulados por cromatina, la metilación de arginina, también puede ser revertida para mantener el equilibrio funcional en la célula. Sin embargo, poco se sabe acerca de las demetilases de arginina. Actualmente, se sabe de dos proteínas implicadas en este mecanismo: PADI4 y JMD6.

PADI4 es el único miembro de la familia proteínas arginina-deiminadas I (PADI) de localización nuclear donde cataliza la deiminación (también llamada citrulinación) de monometil-arginina a citrulina. Se sabe que son dianas de citrulinación por PAD1, las monometilaciones de H3 (R2, R8, R17 y R26) y H4 (R3). PAD1 por tanto no constituye una verdadera enzima demetilasa, puesto que solo convierte las argininas en citrulinas.

Por otra parte, se ha descrito que JMJD6, un miembro de las demetilases de lisinas JMJ, puede demetilar específicamente H3R2 y H4R3 (tanto mono como di-metilados) *in vitro* e *in vivo* (Chang et al., 2007), sin embargo no existen estudios posteriores a este descubrimiento.

### **II.2.4 Interacción entre modificaciones**

La gran diversidad de modificaciones de histonas, así como también el gran número de residuos susceptibles de modificación en las colas de histonas, y la correlación de modificaciones individuales, conducen a la hipótesis de que combinaciones específicas de modificaciones proveen de un “código” de histonas, que posterior a su “traducción” por

determinados factores determinan funciones específicas de la cromatina (Turner, 1993, Strahl and Allis, 2000, Turner, 2000).

Por ejemplo, la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 está correlacionada con distintas funciones, tales como la condensación de la cromatina antes y durante la mitosis (Hendzel et al., 1997, Houben et al., 1999), y en la transcripción durante la interfase (Cheung et al., 2000a). Se ha descrito que la fosforilación en H3S10 precede y facilita la acetilación en H3K14 durante la activación transcripcional (Cheung et al., 2000b, Lo et al., 2000), pero afecta negativamente la metilación en H3K9 (Rea et al., 2000). Para que suceda la metilación de K9 de H3 durante la formación de la heterocromatina en la fisión de levaduras, H3K14 y H3K9 tienen que ser deacetiladas previamente (Nakayama et al., 2001). Modificaciones dentro de la histona (región globular) pueden también influenciar las modificaciones en otras histonas, en un mecanismo regulatorio llamado “trans-histona”. Dicho mecanismo fue descrito por primera vez en *S. cerevisiae*, en donde la ubiquitinación de H2B controla la metilación de H3K79 y H3K4 durante el silenciamiento génico (Sun and Allis, 2002, Briggs et al., 2002).

Dicho esto, existen más datos que sugieren la utilidad de distinguir entre los efectos transcripcionales a corto y largo plazo de las modificaciones de histonas (Turner, 2002). Mientras que la activación transcripcional (consistente en una cascada de eventos temporales) de diferentes genes, podría requerir de distintas combinaciones de modificaciones de histonas (Agalioti et al., 2002, Daujat et al., 2002), el mantenimiento a largo plazo del estado transcripcional, parece compartir características comunes incluso en organismo evolutivamente distantes (Richards and Elgin, 2002). Dado que la expresión génica dependiente de la cromatina, también involucra la metilación del DNA (Jones and Takai, 2001, Martienssen and Colot, 2001) y la unión de RNAs no codificantes (Volpe et al., 2002), el código de histonas puede representar una parte de un “código epigenético” integral, que puede ser responsable en su totalidad de la organización funcional de la cromatina (Turner, 2002).

### III. REMODELADORES DE CROMATINA ATP-DEPENDIENTES

Los remodeladores de cromatina ATP-dependientes son grandes complejos multiproteicos que se encuentran muy conservados en eucariotas. Se caracterizan por presentar una subunidad ATPasa perteneciente a la familia SNF2 de ATPasas y helicasas que contienen un dominio ATPasa compuesto por las regiones DExx y HELICc (Flaus et al., 2006)(Flaus 2006). Estos complejos se agrupan en cuatro familias fundamentales: SWI/SNF, INO80/SWR1, ISWI y CHD, en base a la organización de sus dominios funcionales.

Estos complejos carecen de la capacidad de unirse a los genes de forma específica, por lo que los factores de transcripción suelen dirigir su reclutamiento hacia los promotores donde realizan su acción. Allí emplean la energía derivada de la hidrólisis del ATP para alterar sus interacciones entre DNA e histonas y mediar diferentes acciones, como: el deslizamiento de nucleosomas, variando la posición de estos en el DNA; la creación de un estado remodelado en el que el DNA es más accesible pero las histonas permanecen unidas; la disociación completa entre el DNA y las histonas y el reemplazamiento de histonas por variantes de histonas (Mohrmann and Verrijzer, 2005).

### III.1 SNF2/ISWI

El complejo SWI/SNF (cuyo homólogo humano es SNF2/SWI2) fue el primer complejo remodelador de cromatina descrito. Varias de sus subunidades fueron identificadas genéticamente como proteínas implicadas en la regulación del gen codificante de la endonucleasa *HO* y del gen *SUC2* en levaduras. *HO* es necesario para el intercambio del tipo sexual, de ahí SWI (SWItching deficient), mientras que los mutantes *Suc2* son clasificados como no fermentadores de sacarosa y de ahí el acrónimo SNF (Sucrose NonFermenting) (Workman and Kingston, 1998, Sudarsanam and Winston, 2000). El complejo SWI/SNF está altamente conservado en eucariotas y posee homólogos en *Drosophila* y humanos (Kingston and Narlikar, 1999). La función del complejo SWI/SNF fue inicialmente asociada a la cromatina, cuando se descubrió que mutaciones que suprimían los fenotipos asociados a los mutantes *swi/snf* de levadura correspondían a genes que codificaban proteínas de histonas y otros componentes de la cromatina (Winston and Carlson, 1992). Posteriormente, se comprobó que el complejo SWI/SNF, purificado tanto en levaduras como en humanos, alteraba la estructura de los nucleosomas de forma ATP-dependiente (Cote et al., 1994, Kwon et al., 1994). El complejo SWI/SNF tiene la capacidad de unirse al DNA y a los nucleosomas con alta afinidad, pero sin especificidad de secuencia (Cote et al., 1998, Quinn et al., 1996); contiene un dominio de interacción rico en AT (ARID) que permite la unión no específica al DNA y un dominio conservado SANT que interacciona con los dominios N-terminales de las histonas, y que es importante para la función del complejo (Boyer et al., 2002, Yang et al., 2007). Interesantemente, los complejos SWI/SNF de levaduras y eucariotas superiores contienen proteínas relacionadas con actina, Arp7 y Arp9. Estas proteínas podrían proporcionar una unión a estructuras nucleares, tales como la matriz nuclear (Prochasson et al., 2003, Yang et al., 2007).

### III.2 INO80

La familia de remodeladores INO80/SWRI (*INOsitol requiring 80/Sick UIT Rat8 ts 1*) es única ya que contiene un dominio ATPasa dividido en dos regiones (Bao and Shen, 2011). El gen

INO80 apareció en un rastreo genómico dirigido a la identificación de genes requeridos para la activación del gen de síntesis de inositol INO1, importante en varias rutas de señalización (Ebbert et al., 1999). INO80 juega un papel más amplio que el resto de los remodeladores en la regulación génica ya que participa en la activación transcripcional, en la reparación del DNA y en paradas de las horquillas de replicación (Shen et al., 2000, Shimada et al., 2008). El complejo INO80 carece de dominios de reconocimiento de histonas, por lo que se desconoce cómo es dirigido a los sitios de transcripción, reparación y replicación. El complejo SWR-C/SWR1 es un remodelador de cromatina que altera la composición de los nucleosomas. SWR1 utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para reemplazar la histona H2A por su variante H2A.Z en los nucleosomas del promotor (Guillemette et al., 2005, Li et al., 2005, Raisner et al., 2005, Zhang et al., 2005). H2A.Z promueve la transcripción mediante la desestabilización de nucleosomas (Zhang et al., 2005). Esta variante de histona se ha asociado con estados de cromatina abierta, más que con estados cerrados, aunque su presencia no es suficiente para crear un entorno transcripcionalmente activo.

### III.3 ISWI

Al contrario que los complejos de las familias SWI/SNF e INO80, la familia ISWI (*Immunitation SWItch*) lleva a cabo la organización de la cromatina creando cadenas de nucleosomas uniformemente espaciados, en las que algunos nucleosomas se sitúan en regiones inicialmente desfavorables. En la mayoría de los casos, este proceso tiene un efecto negativo en transcripción (Langst et al., 1999, Ito et al., 1997). Por ejemplo, el complejo ISWI2, junto con la histona deacetilasa Rpd3, crea una organización de nucleosomas que conduce a la represión de genes meióticos (Fazzio et al., 2001). ISWI2 puede también cooperar con otros complejos represores, como TUP1-SSN6, en el mantenimiento de estados represores (Zhang and Reese, 2004). La organización de la cromatina por estos complejos, ayuda a prevenir la transcripción en sentido contrario en regiones intergénicas y la transcripción aleatoria por la RNAP II que tiene lugar si la densidad y localización de nucleosomas no está optimizada (Whitehouse et al., 2007).

### III.4 CHD

Las ATPasas de la familia CHD (*Chromodomain-Helicase-DNA-binding*) se caracterizan por tener un tándem de cromodominios en el extremo amino terminal, además del dominio ATPasa conservado ya mencionado. Se conocen 9 miembros dentro de esta familia que han sido divididos en 3 subfamilias basándose en la similitud de los dominios estructurales que presentan. Los miembros CHD1 y CHD2 se distinguen por presentar un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo, CHD3- CHD5 tienen PHD *fingers* emparejados en el extremo

amino terminal, y CHD6-9 tienen otros dominios funcionales en su extremo carboxilo-terminal.

### **III.4.1 Subfamilia I**

La proteína CHD1 es el primer miembro de la familia CHD descubierto (Delmas et al., 1993) y el único que se encuentra presente en levadura (ScChd1), donde se ha visto que interacciona con los complejos con actividad histona acetil-transferasa (HAT) SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa) y SLIK (SAGA-Like) (Pray-Grant et al., 2005). CHD1 es reclutado a sitios de transcripción activa a través del reconocimiento y unión de sus cromodominios a la modificación H3K4me3 (Flanagan et al., 2005, Sims et al., 2005) y se asocia con factores de pre-iniciación para facilitar la elongación transcripcional y el *splicing* (Sims et al., 2007). La distribución global de Chd1 presenta una fuerte correlación con la marca H3K4me3 y con RNAP II en la región promotora de genes activos. La eliminación de su expresión en células madres embrionarias resulta en la acumulación de heterocromatina y en la pérdida de capacidad pluripotente, sugiriendo que Chd1 es requerida para el mantenimiento de la cromatina en estado abierto necesario para continuar en pluripotencia (Gaspar-Maia et al., 2009). Se conoce mucho menos sobre la otra proteína de esta subfamilia, CHD2. Aunque todavía no se sabe si presenta funciones en transcripción o en el control de la organización de nucleosomas, estudios en ratones que expresan Chd2 sin el dominio de unión a DNA muestran defectos en crecimiento y una mayor letalidad perinatal (Marfella et al., 2006).

### **III.4.2 Subfamilia II**

CHD3 y CHD4, también conocidos como Mi-2 $\alpha$  y Mi-2 $\beta$ , son incorporados en un complejo de múltiples proteínas denominado NuRD (*Nucleosome Remodeling Histone Deacetylase*) que presenta función deacetilasa y actividad remodeladora (Xue et al., 1998, Tong et al., 1998, Zhang et al., 1998, Wade et al., 1998). De entre las proteínas que forman parte del complejo se incluyen HDAC1/2 (deacetilasas de histonas), RbAp48 y RbAp46 (proteínas asociadas a Retinoblastoma), MTA1-3 (proteínas asociadas a metástasis), y MBD2/3 (proteínas que unen DNA metil CpG) (Bowen et al., 2004). El complejo NuRD ha sido relacionado con procesos de inhibición transcripcional. Aunque se desconoce el mecanismo de represión implicado, teniendo en cuenta la alta diversidad funcional de las proteínas constituyentes es razonable pensar que una posible vía de inhibición podría implicar la unión de NuRD a DNA metilado, la remodelación de los nucleosomas para promover el cierre de la estructura y/o la retirada de marcadores de histona activos.

La función de los complejos Mi-2 en desarrollo ha sido muy caracterizada. Las proteínas CHD3 y CHD4 están implicadas en procesos de desarrollo en una alta variedad de organismos. Entre estos procesos se incluyen: la inactivación de genes específicos de células T que conlleva la inhibición de la diferenciación de timocitos, la determinación del destino de células de la vulva en *C. elegans*, la activación de la expresión de CD4, la menor división celular de timocitos en ratón, la regulación de la expresión del gen Hox en *Drosophila*, y la regulación del desarrollo embrionario en plantas (von Zelewsky et al., 2000, Kehle et al., 1998, Ogas et al., 1999, Solari and Ahringer, 2000, de la Serna et al., 2006). Otras funciones atribuidas a CHD3/CHD4, como componentes del complejo NuRD, incluyen la reparación del daño a DNA y su implicación en el envejecimiento celular (Polo et al., 2010, Chou et al., 2010, Pegoraro et al., 2009). La eliminación de éstas proteínas provoca cambios mayores en la estructura de la cromatina y en la aparición espontánea de daño a DNA (Pegoraro et al., 2009, Smeenk et al., 2010), indicando que NuRD actúa como controlador de la estabilidad genómica.

La proteína CHD5 presenta, al igual que CHD3 y CHD4, PHD *fingers* emparejados en el extremo amino-terminal. No se han identificado proteínas asociadas a CHD5. Se expresa principalmente en tejido neuronal (Thompson et al., 2003), y se ha identificado recientemente como gen supresor tumoral localizado en la zona cromosomal 1p36 (Bagchi et al., 2007), región comúnmente deletada en cáncer humano con origen epitelial, neuronal y hematopoyético. CHD5 controla los procesos de proliferación, apoptosis y senescencia celular a través de la regulación positiva de la expresión de p16Ink4a/p19Arf, implicados en la inhibición del ciclo celular (Bagchi et al., 2007).

### **III.4.3 Subfamilia III**

La tercera subfamilia contiene las proteínas CHD6-9. Son proteínas de reciente caracterización y presentan varios dominios adicionales además de los cromodominios y el dominio ATPasa comunes. Existe un homólogo en *Drosophila*, Kismet-L (KIS-L), que pertenece al grupo trithorax. KIS-L se ha visto asociado con cromatina transcripcionalmente activa, facilita la elongación mediada por RNAPII, impide la acumulación de metilación en H3K27 y, por consiguiente, antagoniza la represión mediada por proteínas Polycomb (Srinivasan et al., 2005, Srinivasan et al., 2008).

Las proteínas CHD7, CHD8, CHD9 y KIS-L comparten en el extremo carboxilo terminal una pareja de dominios BRK (*Brahma* y *Kismet*, también llamado TCH), cuya función por el momento es desconocida (Doerks et al., 2002). Mutaciones en CHD7 están asociados en humanos a más del 60 % de los casos del síndrome de CHARGE, patología caracterizada por la manifestación de múltiples anomalías congénitas (Visser et al., 2004). Se han

logrado recapitular muchos de los defectos característicos del síndrome CHARGE en modelos de ratón con deficiencias en CHD7 (Layman et al., 2009, Hurd et al., 2010, Bosman et al., 2005). Se ha determinado que el efecto es probablemente debido a la desregulación transcripcional de genes claves en el desarrollo. Estudios recientes destacan la colaboración, en células de la cresta neuronal, de CHD7 y BRG1 situados juntos en elementos *enhancer* distales para la regulación del programa transcripcional específico de la cresta neuronal (Bajpai et al., 2010). En la misma línea, análisis de ChIP-Seq y ChIP-Chip en células madre embrionarias, han demostrado la colocación de CHD7 con Brg1 y H3K4me1 en sitios *enhancers* distales (Schnetz et al., 2010, Bajpai et al., 2010).

Se han descrito varias proteínas, implicadas en diversos procesos celulares, asociadas a CHD8. Se ha caracterizado su interacción con CTCF (*CCCTC-Binding Factor*), una proteína de unión a los elementos *insulator*, y su contribución en el mantenimiento de las regiones fronterizas entre eu- y heterocromatina (Ishihara et al., 2006). CHD8 también está implicada en la modulación de varias vías de señalización: inhibe apoptosis mediada por p53 durante embriogénesis temprana a través del reclutamiento de la histona H1 (Nishiyama et al., 2009), modula negativamente la expresión de genes activados por  $\beta$ -catenina (Thompson et al., 2008), y está implicada en la proliferación inducida por estrógeno a través de la modulación positiva del gen de la ciclina E2 (Rodríguez-Paredes et al., 2009, Caldon et al., 2009). A nivel transcripcional, CHD8 funciona tanto como modulador negativo como modulador positivo de la transcripción, y la interacción descrita con la RNAP II de elongación podría ser importante para su mecanismo de acción (Rodríguez-Paredes et al., 2009). CHD9, también conocido como CReMM (*Chromatin-Related Mesenchymal Modulator*), parece jugar un papel importante en la regulación de la transcripción durante la diferenciación de células osteogénicas (Marom et al., 2006, Shur and Benayahu, 2005). Además, se ha identificado como coactivador transcripcional en respuesta a proliferadores de peroxisoma que forma parte de un complejo multiproteico junto al receptor nuclear PPARalpha (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) (Surapureddi et al., 2006).

CHD6, proteína objeto de esta Tesis, contiene en su extremo carboxilo terminal, al igual que CHD7, un dominio SANT (*Swi3, Ada2, N-CorR, TRIIIB*) comúnmente presente en proteínas reguladoras transcripcionales donde parece funcionar como módulo de interacción a colas de histonas (Boyer et al., 2004, Aasland et al., 1996, Boyer et al., 2002). Funcionalmente, en nuestro laboratorio hemos observado que CHD6 forma un complejo de alto peso molecular (entre 2 y 3 MDa) y está presente exclusivamente en el núcleo celular, donde colocaliza con las formas hipo- e hiperfosforiladas de la RNA polimerasa II (Lutz et al., 2006). Además, observamos que CHD6 es una enzima funcional al demostrar que exhibe actividad ATPasa DNA-dependiente. También hemos demostrado que ratones sin el



exón 12 de CHD6 (que codifica el motivo I del dominio ATPasa) presentan un fenotipo atáxico (Lathrop et al., 2010). Por otra parte, se ha descrito la interacción de CHD6 con el dominio Neh3 de Nrf2, factor de transcripción crítico en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa celular (Nioi et al., 2005). También se ha podido observar que CHD6 se induce en células linfoblastoides humanas sometidas a radiación gamma de baja dosis y, por lo tanto, podría estar implicado en proliferación celular y radiosensibilidad (Wang et al., 2006b).

#### IV. LA FAMILIA CHD COMO REGULADORES DEL CICLO CELULAR

##### IV.1 El ciclo celular

El ciclo celular básico de las células eucarióticas, se compone de cuatro etapas: una fase de síntesis o replicación del DNA (fase S), una fase de reparto equitativo del material genético a las células hijas (fase M) y dos fases intermedias G1 (entre M y S) y G2 (entre S y M); en las que se produce un crecimiento celular y la evaluación y preparación de las condiciones adecuadas para las fases S y M. La sucesión de etapas que constituyen el ciclo celular eucariótico, parece a su vez estar regulada y coordinada en gran medida por un mecanismo celular conservado en los organismo eucarióticos, que es fundamental para la adecuada formación de dos células hijas a partir de una célula madre. Los reguladores claves del ciclo celular son las proteínas CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*). Las CDKs son un grupo de quinasas de residuos de serina o treonina que forman un complejo heterodimérico activo por unión a las ciclinas, sus subunidades regulatorias. De este modo, tiene lugar la regulación cíclica de la actividad enzimática de CDKs fundamental para la adecuada progresión del ciclo celular (Cross et al., 2011). Las ciclinas también están implicadas en la regulación del ciclo celular, siendo los activadores de las CDKs y, por tanto, responsables de la regulación de éstas. Sus niveles en la célula están a su vez controlados por una sucesión periódica y coordinada de eventos de síntesis y degradación.

En mamíferos la diversificación de los componentes reguladores del ciclo y la especialización funcional de algunos de éstos, complica su estudio (Cross et al., 2011). Así, la familia de proteínas CDK consta de 11 proteínas distintas y se han descrito 14 ciclinas implicadas en el control del ciclo celular, así como varias proteínas más, estructuralmente relacionadas, sin función conocida en la progresión del ciclo (Malumbres, 2005, Satyanarayana and Kaldis, 2009). El análisis genético y bioquímico de distintos factores de estas familias en cultivos celulares ha conducido al desarrollo de un modelo simplificado de regulación del ciclo de células de mamífero. Este modelo implica un grupo reducido de CDKs y ciclinas, directamente implicadas en la regulación del ciclo celular: tres CDKs

interfásicas (CDK2, CDK4 y CDK6), una mitótica (CDK1) y nueve ciclinas pertenecientes a cuatro clases distintas (ciclinas A, B, D y E).

Además de la regulación de la actividad de las CDKs por las ciclinas existen otros niveles de regulación para estas quinasas. Se ha propuesto que los complejos CDK/ciclina requieren para su activación una fosforilación mediada por el complejo CAK (quinasa activadora de CDK) (Kaldis, 1999), y que puede inactivarse mediante fosforilación por las quinasas WEE1 y MYT1 (Morgan, 1997). A su vez, esta fosforilación inhibitoria puede ser revertida por las fosfatasas CDC25 (tres en mamíferos CDC25A-C), lo cual favorece la transición G1/S y la posterior entrada en mitosis (Ekholm and Reed, 2000). Por otro lado, la actividad de las CDKs puede ser inhibida a través de la interacción con proteínas CKI (*CDK Kinase Inhibitors*). Se han descrito dos familias de CKIs: las proteínas INK4 (p16, p15, p18 y p19) responsables de la unión preferente de las quinasas CDK4 y CDK6 y la familia Cip/Kip, compuesta por las proteínas p21, p27 y p57, que inhiben preferentemente las quinasas CDK1 y CDK2 (Blomen and Boonstra, 2007). Curiosamente, a concentraciones fisiológicas, las CKIs p21 y p27 favorecen la formación de complejos CDK4 y CDK6 activos (Sherr and Roberts, 1999). La expresión de las CKIs de la familia INK4 desplaza a las proteínas p21 y p27 de los complejos CDK4 y CDK6 activos, inhibiéndolos y liberando las proteínas p21 y p27 para la inhibición del complejo de ciclinas E/CDK2 (Sherr and Roberts, 1999).

Tras la citocinesis, una célula hija puede continuar el ciclo celular o para el ciclo y entrar en un estado conocido como quiescencia o G0, cuyos parámetros bioquímicos están aun pobremente definidos. En condiciones de laboratorio, este fenotipo se consigue mediante la privación de suero, inhibición por contacto y la pérdida de adhesión celular (Blomen and Boonstra, 2007, Malumbres, 2005). Si la célula va a seguir dividiéndose, progresa a lo largo de la fase G1 hacia la replicación del DNA.

### IV.2 Regulación transcripcional del ciclo celular

La decisión de entrar en fase S para replicar el DNA es probablemente uno de los procesos más controlados en la célula. Por lo tanto, la represión de los genes implicados en la proliferación durante las fases G0 y G1 temprana del ciclo celular, así como la activación de genes específicos de fase S, son procesos estrictamente controlados, los cuales son críticos durante la diferenciación y la homeostasis del tejido, que se encuentran des-regulados en la mayoría de los cánceres (Hanahan and Weinberg, 2011, Malumbres and Barbacid, 2001).

Esta decisión se toma durante la fase G1 del ciclo celular y está regulada fundamentalmente por factores de crecimiento que proceden de señales extracelulares. La señalización mediada por los factores de crecimiento se requiere mínimamente en dos

etapas durante el ciclo celular, para salir de quiescencia y entrar en G1, así como para progresar por las sub-etapas de G1 y continuar hasta fase S (Boonstra, 2003). En general las señales extracelulares afectan a esta decisión solamente hasta que la célula llega al denominado punto de restricción. Es en este momento donde la progresión a lo largo del ciclo celular pasa a ser controlada únicamente por la maquinaria proteica del ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2001).



## **OBJETIVOS**

1. Identificar los genes diana de CHD6 mediante análisis de transcriptómico en células silenciadas.
2. Dilucidar la función endógena de CHD6.
3. Identificar las modificaciones post-traduccionales de histonas que interaccionan con CHD6 endógeno y sus cromodominios.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## MATERIALES Y MÉTODOS

## I. MATERIALES BIOLÓGICOS

## I.1 Líneas celulares eucariotas

Línea celular	Especie	Origen/Características	Medio de cultivo	Procedencia
HEK293T	<i>H. sapiens</i>	Epitelio derivado de riñón	DMEM	Dr. J.C. de la Torre
RPE1	<i>H. sapiens</i>	Epitelio de retina No cancerosa	DMEM/F12	Dr. J.C. Reyes Cabimer, Sevilla (España)

## I.2 Plásmidos

Nombre	Antibiótico (selección)	Promotor	Descripción	Origen (referencia)
pETM-11	Kan <sup>r</sup>	T7	Vector para la expresión heteróloga de una His-proteína	Dr. Guenter Stier
pSUPER.retro.puro (pSR.puro)	Amp <sup>r</sup>	H1	Vector para la expresión shRNA	Oligoengine

## I.3 Secuencias para la construcción de plásmidos de silenciamiento

siRNA	Secuencia diana (5'→3')	Posición en el mRNA de CHD6 (NM_032221.4)
TM	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	No hay coincidencias
siCHD6_ex3	GGACCTGTATACTGCTGAA	355-373
siCHD6_ex9	GTTGATCGCATCTTGGAGG	1307-1325
siCHD6_ex30.1	CAAGCAGACTTCTATAGAA	4541-4559
siCHD6_ex30.2	CGGATGAGAGCCTGGAACA	4650-4668
siCHD6_ex31	GTACCGCATTGAACTGTTA	4795-4813
siCHD6_ex33	AGGACCGCGTGATAATTAAT	6456-6474
siCHD6_ex34	GCGGAAACATGTTGAAGGA	7048-7066
siCHD6_ex37.1	GAAAACAAGTTCAATCACA	7442-7460
siCHD6_ex37.2	GGACTCATTTACCCATCCA	8036-8054

## I.4 Anticuerpos

*Anticuerpos primarios*

Anticuerpo	Proteína antígeno (residuos)	Fuente/origen	Procedencia	WB	IF	IP	ChIP
Anti-CHD6	CHD6 humana	Ratón monoclonal	Abcam	1:150	-	1µg	1µg
Anti-β-TUB	β-Tubulina humana	Ratón monoclonal	Sigma	1:50000	-	-	-
Anti-HA	Hemaglutinina del Virus de la Influenza humana (YPYDVPDYA)	Ratón monoclonal	Sigma	1:1000	-	1µg	1µg
Anti-Pol-II (N-20)	Péptido N-terminal de la RNAP-II de origen murino	Conejo policlonal	Santacruz	1:200	-	1µg	1µg
Anti-poli-His	(6x)His	Conejo policlonal	Sigma	1:600	-	-	-
Anti-IgG-ratón	IgG ratón	conejo	Nordic Immun. Labs.				

### Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Conjugación	Origen	Procedencia	Uso
Anti-IgG-ratón	Peroxiadasa (HRP)	cabra	Southern Biotech. A.	1:3000
Anti-IgG-ratón	No conjugado	conejo	Nordic Immun. Labs.	
Anti-IgG-conejo	Peroxiadasa (HRP)	cabra	Southern Biotech. A.	1:15000
Anti-IgG-rata	Peroxiadasa (HRP)	cabra	Sigma	1:7000

## I.5 Oligonucleótidos

Oligonucleótidos usados para validar el transcriptoma de *CHD6* por RT-qPCR:

Gen	Secuencia (5'→3')	
	Sentido	Antisentido
<b>CHD6</b>	TAAGCCAGATTGACACCGCT	TGAGCCTGCAAGTCATTTTG
<b>NEDD4</b>	GAAAATTCAGCCCATCTGA	CGAGGATCTTCCATTGTGT
<b>GDF15</b>	GAATGGCTCTCAGATGCTCC	GTTAGCAGGTCTCGTAGCG
<b>HPRT1</b>	GTCGTGATTAGTGATGATG	GTTGAGTCTGTCCATAA
<b>SIP1</b>	AAAGTTATGTGCTGACGGGG	GCATAAAGCCATCTTCCCAA
<b>ITM2C</b>	CGAACTCAACACCACATTG	TGGTAGATGAAGGACCCAG
<b>ACTB</b>	CCCAGCACAATGAAGATCAA	CGATCCACACGGAGTACTTG

Oligonucleótidos exon-junction y 3'-UTR para RT-qPCR de *CHD6* y *HPRT1*

Nombre	Secuencia (5'→3')	
	Sentido	Antisentido
<b>CHD6 EJ-12/13</b>	AGAGACGCCCAGGGAAAC	ACAGCTCCAGTGAATCTTCTTC
<b>CHD6 EJ-17/18</b>	TAAGCCAGATTGACACCGCT	TGAGCCTGCAAGTCATTTTG
<b>CHD6 EJ-29/30</b>	CCAGGTAACCAAGGATATTG	CTCTCCTAGTCCACCTCTTT
<b>CHD6 3'UTR</b>	GTCGGGTTGCACAGGAAGA	GCACCAGCACTTCCTTTTCTG
<b>HPRT1 EJ-1/3</b>	CCTGCTTCTCCTCAGCTTCA	CGAGCTGCTCACCACGAC
<b>HPRT1 3'UTR</b>	TTGGAAACATCTGGAGTCTATTG	CAGATGGCCACAGAACTAGAACA

Oligonucleótidos usados para ChIP:

Gen	D.R.*	Posición genómica	Secuencia (5'→3')	
			Sentido	Antisentido
<b>NEDD4</b>	0	chr15:56209249+56209405	TTGTTCTGTGTTACTCATT	CTTGAATCGCTTGATGTC
<b>NEDD4</b>	+75.8	chr15:56134104+56134213	GAGGAGTTGCCAGAGAAT	TGCCGATAATCATTGTAAAGG
<b>NEDD4</b>	+87.2	chr15:56122090+56122226	TCATAACCACTTCTCTC	GTAATCTAATCAACTCCATCA
<b>GDF15</b>	-0.3	chr19:18496654+18496775	ATAGACAGCCACCTCTTA	CCTCAGTATCCTCTTCTT
<b>GDF15</b>	+2.1	chr19:18499013+18499092	GCGTGTAGGGAAATGG	TGGGAAGACAGATAGGGAAG
<b>GDF15</b>	+3.0	chr19:18499919+18499998	GGCTGGTCTGATGGAAT	GACACCACAGGGAACAGT
<b>HPRT1</b>	-0.1	chrX:133593994+133594203	GGGAGCCCTCTGAATAGGAG	TGCTTCTCCTCAGCTTCAGG
<b>HPRT1</b>	+15.0	chrX:133609217+133609369	ACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA
<b>HPRT1</b>	+40.0	chrX:133634180+133634337	AGTTCTGTGGCCATCTGCTT	TTTGGGCGGATTGTTGTTTA

\*D.R. = Distancia relativa del TSS (kpb)

**I.6 Microarray de oligonucleótidos**

*Whole Human Genome Microarray Kit*, 4x44K. ID 014850. Agilent Tech.

**I.7 Inmunoprecipitación de cromatina**

*SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)*. No. CAT: 9003

**I.8 Array de péptidos modificados**

*MODified™ Histone Peptide Array*. No.CAT: 13001. Active Motif

**I.9 Resinas para purificación de His-proteínas**

*ProBond™ Nickel-Chelating Resin*. No. CAT: R801-01. Life Tech.

**I.10 Reactivos y otros materiales biológicos**

*Protein A-Sepharose®*. Sigma

*DNA-PREP stain*. No. CAT: 660755. Beckman-Coulter Inc.

*Poly-Prep Chromatography Columns*. No. CAT: 731-1550. Biorad

*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. No. CAT: 4368814. Applied Biosystems

*Power SYBR® Green PCR Master Mix*. No. CAT: 4367659. Applied Biosystems

**II. MÉTODOS****II.1 Manipulación de cultivos celulares****II.1.1 Mantenimiento de cultivos celulares**

Las líneas celulares HEK293T y HEK293T/T-REx(HA-CHD6) se cultivaron en medio DMEM (*Dubelco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y aminoácidos no esenciales. Por otro lado las células RPE1 se cultivaron en medio DMEM/F12 (*Dubelco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*) provisto comercialmente de 3,2g/L de D-glucosa, 15Mm HEPES, 1,2g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 2,0mg/L de piridoxina, 55mg/L de piruvato y 0,365 g/L de L-glutamina (Life tech.) suplementado con FBS al 10%. Para la tripsinización de todas las líneas celulares se utilizó tripsina-EDTA diluido al 10%.

Todos los cultivos se mantuvieron en incubadores *Steri-Cult CO2 Incubator 3035* (Thermo/Forma Scientific) bajo una atmósfera húmeda a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

**II.1.2 Transfecciones**

Las transfecciones transitorias de cultivos subconfluentes tanto de células HEK293T como RPE1 se realizaron con fosfato cálcico según el protocolo descrito (Graham and van der Eb,

1973, Wigler et al., 1979). Brevemente para la transfección de  $1 \times 10^7$  células se mezclaron se 20-30µg de plásmido con 500µL de  $\text{CaCl}_2$  que posteriormente se añadieron gota a gota sobre 500µL de solución HBS (50mM HEPES, 1,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 140mM de NaCl, pH 7,05). Tras 1 minuto de incubación se añadió la mezcla suavemente sobre las células y se incubaron a 37°C durante 24h. En caso de partir de un menor número de células, se escaló proporcionalmente la cantidad de reactivos.

### **II.1.3 Aislamiento de núcleos**

Los núcleos de células HEK293T/T-REx-HA-CHD6 que posteriormente fueron utilizados para la inmunopurificación de HA-CHD6 se aislaron según la adaptación de un protocolo anterior (Andersen et al., 2002). Las células se recogieron en PBS a 4°C y fueron lavadas varias veces con PBS suplementado con inhibidores de proteasas. Después fueron resuspendidas en un buffer A, se incubaron en hielo durante 10min y se procesaron 10 veces con un homogenizador Dounce. Los núcleos resultantes fueron purificados centrifugándolos a través de una cama de sacarosa [350mM]. Se resuspendieron en un buffer de congelación y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, para después guardarse a -80°C hasta el momento de su utilización.

**Buffer A:** HEPES pH7,9 [10mM], KCl [10mM],  $\text{MgCl}_2$  [1,5mM], DTT [0,5mM] y Complete®EDTA-free (Roche) 1/25.

**Buffer de congelación:** Tris-HCl pH8,0 [50mM],  $\text{MgCl}_2$  [5mM], EDTA [0,1mM], Complete®EDTA-free (Roche) 1/25 y glicerol 10%.

## **II.2 Métodos de manipulación y análisis de DNA**

### **II.2.1 Clonajes**

Los plásmidos de silenciamiento empleados (mostrados en la tabla correspondiente del apartado I.3 de Materiales) fueron generados siguiendo las recomendaciones descritas por *Oligoengine*. Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos que contienen las secuencias siRNA contra CHD6 en ambos sentidos, la secuencia de la horquilla y sitios de corte para BglII y HindIII en los extremos. En base a este diseño se sintetizaron químicamente dos secuencias complementarias, se anillaron y se ligaron en el vector pSR-puro digerido con BglII y HindIII. Los plásmidos resultantes, anotados como siCHD6\_ex-, expresan *short-hairpin* RNAs (shRNAs) complementarios a diversas regiones diana de la secuencia codificante de CHD6, descritas en el apartado 1.3 de Materiales.

Como plásmido control de silenciamiento se utilizó un plásmido pSR-puro-TM (anotado simplemente como TM) que expresa un sh-RNA no silenciable y derivado de un transcrito de

la bacteria *Thermotoga maritima* (Rodríguez, 2009). La secuencia de este siRNA no hibrida con ningún gen de mamífero conocido.

Todos los clonajes fueron confirmados mediante secuenciación directa.

### **II.2.2 Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano**

Las extracciones a pequeña o gran escala tanto de los plásmidos de silenciamiento (pSR-puro) o del plásmido de expresión (pETM-11) se llevaron a cabo mediante los kits de purificación de DNA plasmídico Quiagen® Miniprep y Maxiprep respectivamente, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

### **II.2.3 Transformación de bacterias**

Para transformar se mezclaron 200µL de células competentes *E.coli* DH5α con 50-100ng de DNA y se incubaron en hielo durante 20min. Posteriormente las células se sometieron a choque térmico de 42°C durante 45s, tras lo cual se añadió 1mL de LB y se incubaron a 37°C en agitación durante al menos 45min en función del gen de resistencia del plásmido introducido. Las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB suplementadas con el antibiótico de selección.

### **II.2.4 Cuantificación de DNA**

La concentración de DNA en solución fue estimada por el espectrofotómetro ND-1000 (nano-drop).

### **II.2.5 Electroforesis de DNA**

Para la electroforesis de DNA en geles de agarosa se utilizaron sistemas horizontales y geles de agarosa del 0,7-2% (p/v) en buffer Tris-acetato/EDTA (TAE) 1x. El porcentaje de agarosa dependía del tamaño de los fragmentos de DNA que a analizar. A todos los geles se les añadió un agente intercalante (SYBR®-safe DNA gel stain) alternativo al bromuro de etidio según las indicaciones del fabricante.

Antes de realizar las electroforesis se añadió a cada muestra 1/10 de su volumen de buffer de carga 10X. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA analizados se utilizaron los patrones comerciales φX174 DNA-HaeIII Digest (NEB), λ DNA-BstEII Digest (NEB) o ladder 50pb-plus® (PB-L Inc.) según el tamaño a analizar.

El DNA se visualizó mediante un transiluminador Gel-Doc 2000 (Biorad).

**Buffer de carga 10X:** azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno-cianol FF 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

### **II.2.6 Secuenciación**

La secuenciación de fragmentos de DNA la realizó la empresa Secugen (Madrid, España).

### **II.2.7 PCR a tiempo real**

Las PCRs cuantitativas (qPCR) o a tiempo real se hicieron con el termociclador de PCR a tiempo real *7500 Real Time PCR System* (Applied-Biosystems) que permite conocer la cantidad de DNA amplificado en cada momento de la reacción.

El diseño de oligonucleótidos para uso en qPCR, se hizo mediante el programa AlleleID® versión 7.7 (Applied Biosystems). Mediante este programa se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la tabla de oligonucleótidos (ver apartado I.5 de Materiales Biológicos). Los dos parámetros fijados para la selección de estos fueron: (i) el tamaño de fragmento amplificado (60-200pb) y (ii) la  $T_m$  de los oligos ( $60^{\circ}\text{C} \pm 5$ ). Para el caso de las parejas de oligonucleótidos *exon-junction* o *EJ*- (situados en la unión de dos exones) usados para detectar formas procesadas de mRNA de CHD6 y HPRT1, ambos o al menos uno de ellos es *exon-junction*.

Para probar la validez de las parejas de oligos se hizo una curva patrón con al menos 4 diluciones factor 10 de la muestra de DNA. Las eficiencias para cada pareja se calcularon en base a la pendiente de la curva patrón, siendo las parejas de oligos con pendientes cercanas a -3,3 las usadas en los experimentos.

Para la reacción de PCR, el DNA (2 $\mu\text{L}$ ) proveniente tanto de la reacción de retrotranscripción (cDNA) como el DNA inmunoprecipitado por ChIP se mezcló en frío con: 2 $\mu\text{L}$  de una mezcla de oligonucleótidos (sentido y antisentido a 5 $\mu\text{M}$  cada uno), 6 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 10 $\mu\text{L}$  de reactivo *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied-Biosystems). Siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las condiciones de termociclado estándar fueron: 1 ciclo de 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido de 40 ciclos de {(15s a  $95^{\circ}\text{C}$ )-(60s a  $65^{\circ}\text{C}$ )} y 1 ciclo de disociación que consiste en {(15s a  $95^{\circ}\text{C}$ )-(60s a  $65^{\circ}\text{C}$ )-(15s a  $95^{\circ}$ )-(15s a  $60^{\circ}\text{C}$ )}, cuya utilidad es la detección de posibles amplificaciones provenientes de contaminantes o dimerizaciones.

Para todos los experimentos de qPCR se utilizaron triplicados biológicos y de medición.

## **II.3 Métodos de manipulación y análisis de RNA**

### **II.3.1 Obtención de RNA total**

El aislamiento de RNA a partir de células se realizó con el sistema *TRI-Reagent®* (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema se basa en una versión mejorada de extracción de RNA en un solo paso de Chomczynski (Chomczynski and Mackey, 1995),

mediante una mezcla de tiocianato de guanidinio y fenol en una solución monofásica. Es un método probado y usado ampliamente de extracción de RNA.

### ***II.3.2 Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa***

Para la electroforesis de RNA en geles de agarosa se utilizaron sistemas horizontales y geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS)/EDTA 1X y 1,5% de formaldehído. El agua utilizada para el buffer y los geles fue tratada previamente con dietilpolicarbonato (DEPC) para evitar la degradación por RNAsas.

Antes de realizar las electroforesis, se añadió a cada muestra 1/10 de su volumen, de buffer de carga formamida 10X y 1 µL de bromuro de etidio (5 µg/µL). Nunca se utilizó patrón de tamaño.

**Buffer MOPS/EDTA 10X:** MOPS [200mM], EDTA [50mM], acetato de sodio [21mM] pH 7,0.

**Buffer de carga formamida:** buffer MOPS/EDTA 1,25X, formamida desionizada 62,5% (v/v), formaldehído [1,14M], azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (p/v).

### ***II.3.3 Cuantificación de RNA total***

La concentración de RNA en solución se estimó por el espectrofotómetro ND-1000 (nanodrop).

### ***II.3.4 Síntesis de cDNA***

Para la obtención de cDNA a partir de RNA, se utilizó el sistema *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem) siguiendo las instrucciones el fabricante, a partir de 0,02-0,1 µg de RNA total en un volumen de 20 µL. Las reacciones de PCR en tiempo realizaron según se describe más adelante, a partir de 2 µL de la reacción de retrotranscripción. Generalmente se utilizaban 300ng de RNA para la síntesis de cDNA.

### ***II.3.5 Microarray***

Se extrajo el RNA total de las células HEK293T tras 48 horas de transfección con los plásmidos siCHD6\_ex30.1 o con el plásmido TM mediante *TRI-Reagent®* y se purificó con el protocolo *RNeasy Clean-Up* (Qiagen). A continuación se amplificó 1 µg de cada RNA y se marcó agregándole un nucleótido aminoalil utilizando el kit *MessageAmp™ II RNA* y aa-dUTP (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante; se obtuvo aproximadamente 40-50 µg de RNA. Para cada muestra, se resuspendieron 3.5 µg de RNA en 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.0) y se marcó con Cy3 o con Hy5 (Cy<sup>TM</sup>Dye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham), ambas marcas fueron intercambiadas y se aplicó la subsecuente corrección del fondo. Las muestras fueron purificadas siguiendo las instrucciones del fabricante

Megaclear™ (Ambion). La incorporación de Cy3 y Hy5 fue medida mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Tech. Inc.).

El protocolo utilizado fue publicado por Agilent Technologies. Las muestras se cargaron en soportes conteniendo la colección de secuencias de todo el genoma humano (*Oligo Microarrays 4x44K* ID 014850, Agilent Tech.); 4 réplicas biológicas se hibridaron independientemente para cada comparación transcriptómica. Las imágenes para los canales de Cy3 y Hy5 fueron equilibradas y capturadas con un equipo GenePix 4000B (Axon) y los puntos se cuantificaron utilizando el software GenPix (Axon).

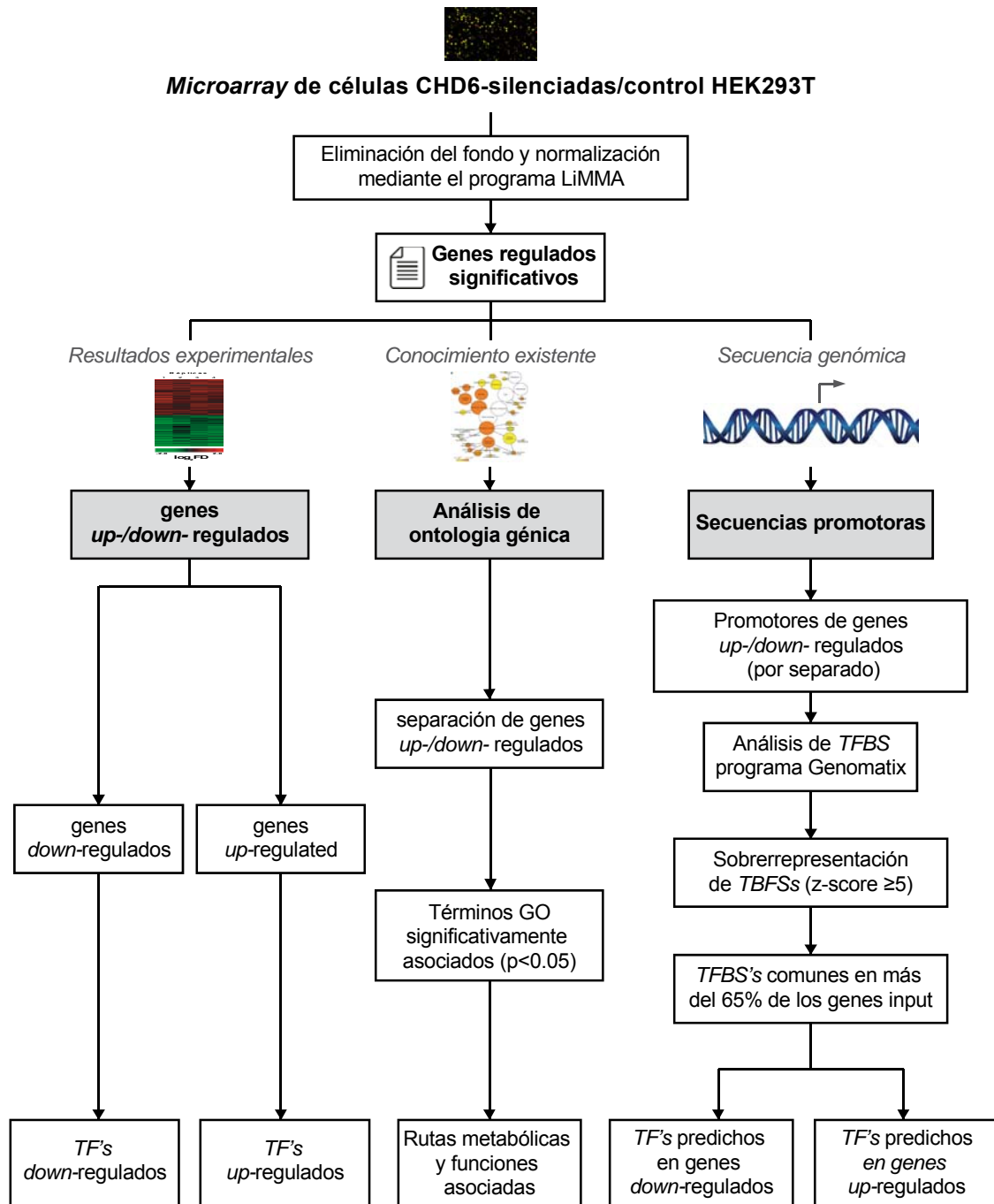
### II.4 Métodos bioinformáticos

Para abordar la función biológica de CHD6 se utilizaron tres líneas de evidencia, las cuales se explican en la **figura M1**.

#### II.4.1 Normalización y corrección de fondo del microarray

La corrección de fondo y la normalización de los datos de expresión fue llevada a cabo utilizando el paquete R/Bioconductor LiMMA (Tabas-Madrid, 2012; Nogales-Cadenas, 2009]. En primer lugar, el conjunto de datos fue filtrado en base a la calidad de los puntos. Se utilizó una estrategia para la corrección de fondo adaptativa que evita la excesiva variabilidad de los cocientes de los logaritmos de los puntos de baja intensidad. Para la corrección de fondo local se utilizó el método “normexp” (LiMMA) y se ajustó la mediana local del fondo. Los cocientes de los logaritmos resultantes de cada *array* se normalizaron mediante la normalización “*print-tip loess*”. Para obtener distribuciones similares a lo largo de los *arrays* y para mantener una consistencia entre los mismos, los cocientes de los logaritmos fueron puestos en escala utilizando como estimador de escala el valor absoluto de la mediana (Nogales-Cadenas, 2009). Los métodos de modelos lineales se utilizaron para determinar la expresión diferencial de los genes. En cada soporte se evaluaron los cambios en la expresión de los genes utilizando el estadístico moderado empírico de Bayes (Nogales-Cadenas, 2009). Para controlar la tasa de falsos valores p (FDR) se corrigieron los datos por el método de Benjamini y Hochberg (Carmona-Saez, 2007). La FDR fue menor al 5%. Los genes significativamente regulados fueron aquellos con un valor  $p \leq 0.05$  y un  $FD \geq 1.24$  o  $FD \leq -1.24$  para genes positiva o negativamente regulados respectivamente.





**Figura M1. Estrategia de análisis: múltiples líneas de evidencia.**

Las tres principales líneas de evidencia derivan de un análisis estadístico de genes diferencialmente expresados. Dichas líneas basan su análisis a partir de tres tipos de datos: (a) Cambios en los valores relativos de mRNA (b) análisis de literatura en bases de datos y (c) análisis bioinformático basado en las secuencias promotoras. Cada resultado de todas las tres líneas de evidencia fue utilizado para restringir el siguiente paso de análisis (indicado por flechas). Los factores de transcripción (TFs), obtenidos a partir de los genes up-/down regulados fueron los únicos datos experimentales. La estrategia global se ha enfocado en el análisis de TFs o TFs potenciales y sus dianas de regulación a fin de comprender los efectos transcripcionales del silenciamiento de CHD6.

### II.4.2 Análisis de las secuencias promotoras

Todos los análisis de secuencia de los promotores de los genes regulados significativamente se llevaron a cabo utilizando el paquete de análisis estándar integrado Genomatix Software Suite (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) y las bases de datos y las herramientas contenidas en este paquete. Las secuencias de los promotores utilizadas para los análisis de TFB fueron extraídas de la base de datos de genomas El Dorado (liberada en 12/2010) utilizando la herramienta Gene2Promoter. Se utilizaron las secuencias desde 1000 pb *upstream* hasta 200 pb *downstream* del sitio de inicio de la transcripción para los 126 genes regulados positivamente y para los 122 genes regulados negativamente. Un análisis adicional se basó en la hipótesis de que la sobrerrepresentación de motivos potenciales de unión a factores de transcripción en un conjunto de promotores de genes regulados podría indicar una relación regulatoria. Para un factor dado de transcripción, pueden estar descritas múltiples matrices dependiendo de la fuente o repositorio, conllevando a múltiples combinaciones para una posición similar. Mediante la utilización del agrupamiento por dominios funcionales basado en la aparición de di/tri/tetra-nucleótidos y adicionalmente una sub-agrupación funcional, las matrices TFBS pueden ser agrupadas según su similitud funcional, conociéndose como familias TFBS. Con el objetivo de hacer hincapié en la representación funcional de los motivos TFBS sobrerrepresentados en un grupo de promotores, utilizamos el concepto de la familia de matrices TFBS. Las familias de matrices TFBS son grupos de TFBS que corresponden al mismo factor de transcripción o a factores de transcripción similares funcionalmente. Por lo tanto, se espera que miembros de la misma familia de TFBS tengan una similitud funcional adicionalmente a la similitud del dominio de unión.

La sobrerrepresentación de un motivo se midió automáticamente por la herramienta con el siguiente método:

Los *z-scores* proveen una medida de la distancia de la muestra a la media de la población de referencia. En este caso, la muestra se refiere al número de combinaciones observadas de cada TFBS particular en un conjunto dado de *inputs* de secuencias y la referencia corresponde al número de combinaciones del mismo TFBS en poblaciones de igual tamaño de secuencias de promotores del genoma humano.

$$z(X) = \frac{n_{obs}(X) - n_{exp}(X) - 0.5}{S(X)}$$

En donde:

$z(X)$  es un *z-score* de sobrerrepresentación de una familia de sitios de unión de factores de transcripción ( $X$ ).

$n_{obs}(X)$  es el número de combinaciones observadas de  $X$  en un conjunto de secuencias promotoras.

$n_{exp}(X)$  es el número esperado de combinaciones de  $X$  en muestras de secuencias del mismo tamaño en un fondo de promotores del genoma humano.

$S(X)$  es la desviación estándar de la población del número de combinaciones de  $X$ .

### **II.4.3 Análisis de ontología genética**

El programa utilizado para llevar a cabo el análisis de ontología genética (GO) fue el *GenCodis* (<http://genecodis.cnb.csic.es/>). Las anotaciones de ontología genética enriquecidas fueron identificadas para los genes regulados positiva o negativamente utilizando los valores de  $p$  obtenidos mediante el análisis hipergeométrico corregido por el método FDR. Se consideraron las anotaciones de GO de los genes con valor  $p \leq 0.01$  y sustentadas por un mínimo de dos genes.

## **II.5 Análisis de ciclo celular**

### **II.5.1 FACS**

Cultivos celulares de HEK293T o RPE1 establemente transfectadas con los distintos silenciadores fueron sembradas en una cantidad de  $7 \times 10^3$  células por placa. Las células fueron recolectadas con tripsina-EDTA a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) y se fijaron con etanol frío 70% durante la noche. A continuación las células se centrifugaron y se lavaron en frío con PBS 1X, posteriormente se tiñeron con yoduro de propidio durante 30min a 37°C en oscuridad y se analizó el contenido de DNA mediante citometría de flujo con el citómetro *Coulter Epics XL MCL Flow Cytometer* (Beckman-Coulter).

### **II.5.2 Progresión de la fase S**

Para evaluar la tasa de progresión de la fase S del ciclo celular se transfectaron células HEK293T con los distintos silenciadores siguiendo el protocolo de transfección descrito anteriormente. Transcurrido un período de 24h post-transfección, las células creciendo en fase exponencial se incubaron con 20  $\mu$ M de bromodeoxiuridina (BrdU) durante 1 hora; luego se lavaron dos veces con medio nuevo y se recolectaron las células a diferentes tiempos con tripsina-EDTA. Posteriormente las células se fijaron metanol frío al 80% durante toda la noche a -20°C para luego resuspenderlas e incubarlas durante 1h a 37°C en una solución de HCl (2N), Tritón X-100 0,5% (v/v) y pepsina. A continuación las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 1h a 37°C con el anticuerpo anti-BrdU-FITC (BD Biosciences). Por último las células se lavaron nuevamente y tiñeron con yoduro de propidio durante 30min en oscuridad para analizar el contenido de DNA por citometría de flujo (Beckman-Coulter) utilizando un equipo *Multicycle AV* (Phoenix Flow Systems).

### II.6 Métodos de análisis de proteínas (SDS-PAGE)

Se siguió el protocolo estándar de Laemmli (Laemmli, 1970), para geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, utilizando el sistema Tris-Glicina.

Para todas las proteínas analizadas el patrón añadido fue *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-rad) que tiene comprende un rango de tamaños de 10-250kDa. En función de las proteínas analizadas, los geles empaquetadores se prepararon del 6% (CHD6) o del 12% (para His-cromodominios e His-hCLE) y se migraron en cubetas *SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit* (Hoefer Inc.), inmersos en el buffer de electroforesis y fijando el amperaje (35mA/gel) durante un tiempo de al menos 4h para el caso de CHD6 o 2h para los His-cromodominios o His-hCLE.

**Gel empaquetador:** Tri-HCl pH6,8 [0,125M], poliacrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1) 4% (v/v), SDS 0,1% (p/v). Se polimeriza con APS 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v).

**Gel separador:** Tris-HCl pH8,8 [0,375M], poliacrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1) 6% o 12% (v/v), SDS 0,1% (p/v). Se polimeriza con APS 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v).

**Buffer de electroforesis:** Tris [25mM], glicina pH8,3 [192mM], SDS 0,1% (p/v).

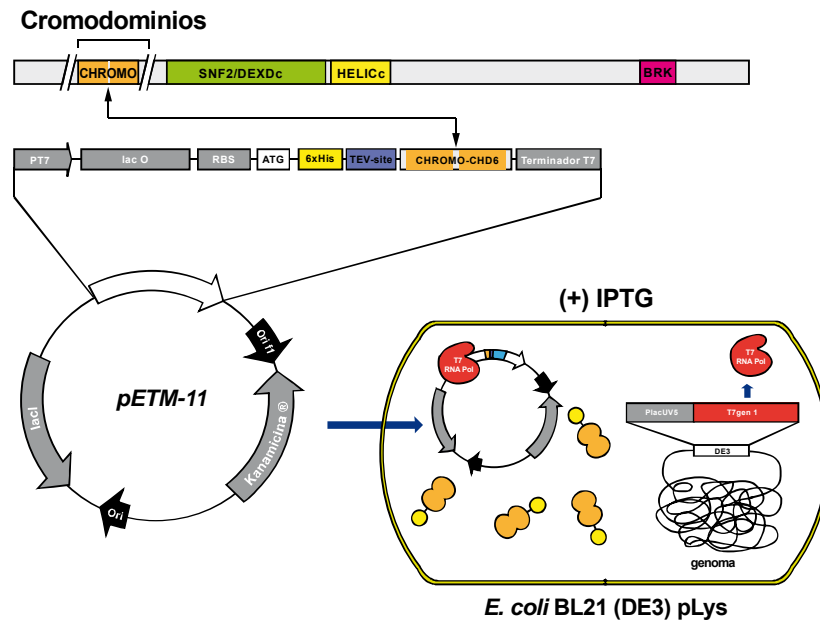
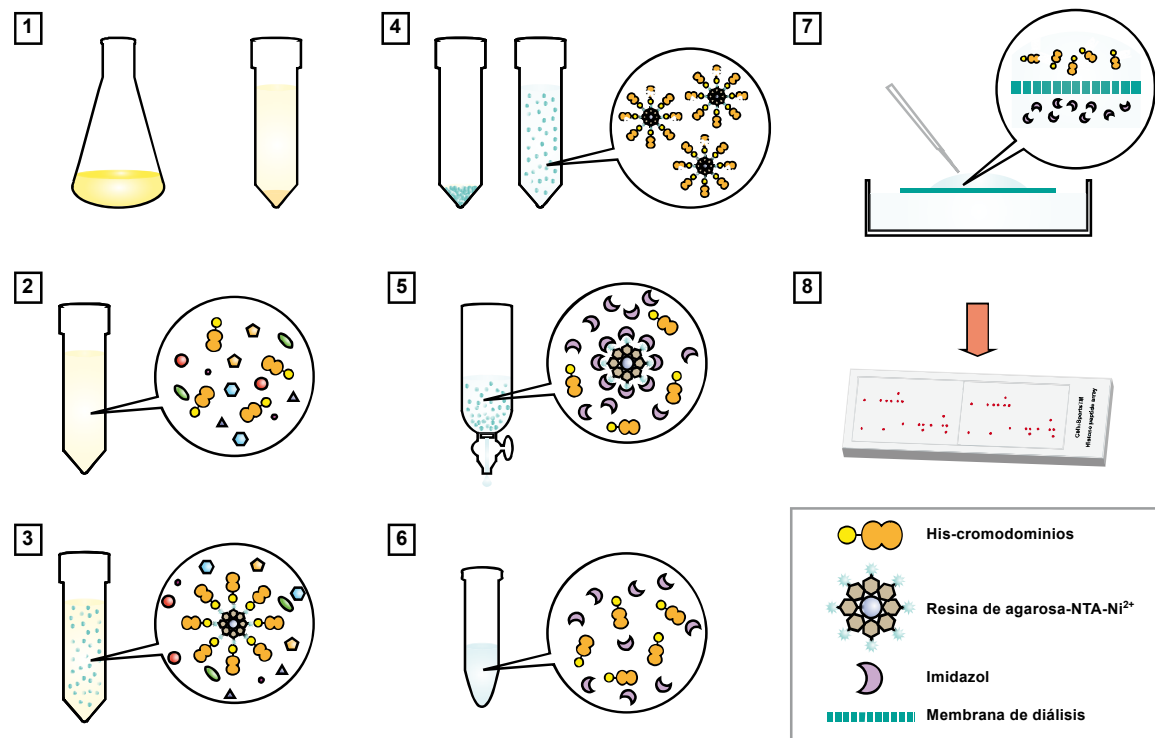
### II.7 Purificación de His-proteínas

Se transformaron bacterias BL21 (D3) pLysS con 5µL de plásmido pETM-11/cromodominios y a partir de una colonia se inoculó 5mL de medio LB con cloranfenicol (35µg/mL) y kanamicina (30µg/mL) y se incubaron a 37°C durante la noche en agitación. Posteriormente el preinóculo se llevó a un volumen de 100mL con medio LB+antibióticos y se crecieron hasta alcanzar O.D.<sub>600nm</sub>=0,5; en ese momento de añadió IPTG para una concentración final de [0,4mM]. El tiempo de inducción con IPTG fue de 2h. Una vez inducidas, las células se centrifugaron y se resuspendieron en un buffer de sonicación, para sonicarlas en frío con 8 pulsos de 30s/30s (on/off) y una amplitud del 90%. Los lisados obtenidos se clarificaron antes de mezclarlos con 1 mL de resinas de níquel *ProBond™ Nickel-Chelating Resin* (Life Tech.) durante al menos 2h. Posteriormente las resinas se lavaron varias veces con buffer de lavado para finalmente eluir mediante competición con imidazol con 2 mL de buffer de elución usando una columna de cromatografía *Poly-Prep Chromatography Columns* (Bio-rad). Se recogieron fracciones de 200µL.

**Buffer de sonicación:** Tris-HCl pH8,0 [50mM], NaCl [500mM], MgCl<sub>2</sub> [5mM], imidazol [20mM], igepal 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v) y Complete®EDTA-free (Roche) 1/25.

**Buffer de lavado:** Tris-HCl pH8,0 [20mM], KCl [1M], MgCl<sub>2</sub> [5mM], imidazol [50mM], igepal (Sigma) 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v).

**Buffer de elución:** Tris-HCl pH8,0 [20mM], KCl [1M], MgCl<sub>2</sub> [5mM], imidazol [1mM], igepal 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v).

**A****B****Figura M2. Expresión y purificación de los cromodominios de CHD6.**

(A) Los cromodominios de CHD6 fueron clonados en el vector de expresión pETM-11, mismo que fue usado para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLys para luego inducir la expresión de los His-cromodominios mediante inducción con IPTG. (B) Esquema resumen que indica los pasos importantes en la purificación de los His-cromodominios: 1) Se transforman las bacterias BL21 con el plásmido pETM-11/His-cromodominios y se crecen con los antibióticos de resistencia y de selección (Kanamicina y cloranfenicol) y se induce la expresión con IPTG 2) Se obtienen los lisados celulares y se elimina la materia insoluble 3) se incuban los lisados con las resinas de Ni<sup>2+</sup> 4) los complejos resinas-Ni<sup>2+</sup>-His-cromodominios se lavan varias veces con buffer salino e imidazol para eliminar contaminantes y uniones inespecíficas 5) y 6) se eluyen los His-cromodominios de los complejos mediante competición con altas concentraciones de sales e imidazol 7) las fracciones de elución obtenidas son dializadas mediante una membrana de ósmosis 8) finalmente las fracciones que contienen los His-cromodominios son usadas para la incubación en el array de péptidos modificados de histonas.

### II.8 Métodos inmunológicos e inmunohistoquímicos

#### II.8.1 Experimentos de Western-Blot

Para realizar los ensayos de *Western Blot*, las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF *Trans-Blot® Transfer Medium* (Bio-rad). La transferencia se llevó a cabo con un aparato de transferencia húmeda *TE22 Mighty Small Transfer Tank* (Hoefer Inc.) utilizando un buffer de transferencia y fijando el amperaje en función del área de transferencia, por ejemplo, para un gel de acrilamida 6% de 81cm<sup>2</sup> (para CHD6), se usaron 350mA, mientras que para uno del 12% (cromodominios) se fijó en 250mA, durante toda la noche en el primer caso y 2h para el segundo.

La transferencia se verificó tiñendo las proteínas de la membrana con una solución de rojo Ponceau S, tras lo cual se añadió la solución de bloqueo durante al menos 1h. Los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo se añadían, y se dejaban incubar determinados tiempos en agitación en función del anticuerpo (anti-CHD6, a 4°C toda la noche, el resto al menos 1h a RT). Posteriormente la membrana se lavaba tres veces por períodos de 15 min en agitación con solución de lavado y se incubaba de nuevo por 1h con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. A continuación se hacían tres nuevos lavados de 10 min y luego la membrana se revelaba con un sistema no comercial de ECL, mezclando ácido p-cumárico, luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para la detección de la señal luminosa se usaron películas fotográficas CURIX/RP2 Plus® (AGFA).

**Buffer de transferencia en húmedo:** Tris [96mM], glicina [78mM], SDS 0,066% (p/v) y metanol 40% (v/v).

**Solución de rojo Ponceau S:** Ponceau S (Sigma) 0,1% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

**Solución de bloqueo:** Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) 5% (p/v), en solución de lavado.

**PBS 1X:** NaCl [136mM], KCl [2,7mM], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O [10mM] y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [1,4mM]

**Solución de lavado:** Monolaurato de polioxietilensorbitano [(Tween-20) (Sigma)] 0,05% (v/v) en PBS 1X

**Substrato para ECL:** Tris-HCl pH8,5 [100mM], luminol (en DMSO) [250mM], ácido p-cumárico [90mM].

#### II.8.2 Inmunopurificación de HA-CHD6

Se aislaron núcleos de 4X10<sup>7</sup> células HEK293T/T-REx/HA-CHD6 tanto inducidas con doxiciclina (Dox+) como no inducidas (Dox-) según lo descrito en el apartado II.1.3 de Métodos. Posteriormente se lisaron los núcleos con buffer de lisis y se añadió Benzonasa® Nuclease (Novagen) para digerir el DNA y evitar la formación de agregados. A continuación los lisados se clarificaron por centrifugación y se incubaron durante toda la noche a 4°C en

noria con resinas de proteína A-sefarosa que previamente fueron unidas al anticuerpo monoclonal anti-HA, aumentando su unión a la proteína A con el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG-ratón. Paso seguido las resinas se lavaron diez veces por períodos de 5 min a 4°C en noria con buffer de lavado y a continuación se dejaron competir con una solución saturada del péptido HA.11 (YPYDVPDYA) (Bio-Legend) durante 3h. Por último las resinas se centrifugaron y el sobrenadante fue usado para comprobar la inmunopurificación mediante *Western-Blot* y para su análisis en el array de péptidos modificados de histonas.

**Buffer de lisis:** Tris-HCl pH7,5 [50mM], NaCl [150mM], MgCl<sub>2</sub> [1,5mM], EDTA [1mM], igepal (Sigma) 0,5% (v/v), DTT [1mM], glicerol 10% (v/v), Complete®EDTA-free (Roche) 1/25 y Benzonasa® Nuclease (Novagen) [30U/mL de buffer lisis].

**Buffer de lavado:** Tris-HCl [50mM], NaCl [200mM], EDTA [5mM] e igepal 0,5% (v/v).

**Solución saturada de péptido HA:** Tris-HCl [50mM], NaCl [200mM], EDTA [5mM], igepal 0,5% (v/v) y péptido HA (500µg/mL).

### II.8.3 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP se realizaron con el sistema *Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP kit* (Cell-Signaling Tech.) según las especificaciones del fabricante. Brevemente, se realizó un *cross-linking* de  $2 \times 10^6$  células con 1% de formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. El *cross-linking* fue interrumpido con la adición de 125 mM de glicina. Las células fueron lavadas con PBS frío, se les agregó 10 mM de PMSF y luego fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en buffer de lisis con SDS. Los lisados se incubaron con Micrococcal Nucleasa (*MNase*) (1000 gel/unidades) durante 20 min a 37°C, luego los lisados se sonicaron para producir fragmentos de ADN de entre 0.2 y 1 kb de tamaño y los restos se eliminaron de las muestras por centrifugación durante 10 min a 10.000 xg. Se guardó una alícuota de cada solución de cromatina (40 µl) y que se designó como el *input*. Una concentración arbitraria de 20 µg de cromatina fue incubada en buffer de inmunoprecipitación con 2 µg del anticuerpo policlonal α-CHD6 (Bethyl) o con 2 µg del control negativo, el anticuerpo policlonal α-HA (Santa Cruz). Se incubaron toda la noche a 4°C con rotación. Añadir los otros Ac. Los complejos inmunes fueron recogidos con la adición de bolitas magnéticas de proteína G con agarosa, seguidos de varios lavados con buffers apropiados, según las especificaciones del fabricante. Cada muestra fue tratada con el buffer de elusión a 65°C durante 30 min. Los sobrenadantes eluidos de cromatina fueron recuperados e incubados durante 2 horas en 200 mM de NaCl con 50 µg/ml de proteinasa K para digerir la proteína. El ADN inmunoprecipitado fue recuperado mediante columnas de alta afinidad y analizados por RT-PCR en tiempo real. Los cebadores utilizados en ChIP se muestran en la tabla de oligonucleótidos del apartado I.3 de Materiales.

### II.9 Métodos de análisis de modificaciones de histonas

#### II.9.1 Array de péptidos modificados de histonas

Para probar la unión de las distintas proteínas (HA-CHD6, His-cromodominos de CHD6 o His-hCLE) con modificaciones de histonas se utilizó el *array* comercial de péptidos modificados de histonas *MODified™ Histone Peptide Array* (Active Motif), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el método consiste en bloquear el *array* con leche 5% en buffer TTBS (*Tris-Buffered Saline-Tween*), una vez bloqueado por al menos 4 horas se realizaron tres lavados de 5 min en agitación con buffer TTBS y a continuación se hibridó con la proteína en cuestión durante toda la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados de 5 min en agitación y se incubó por 2h con el anticuerpo primario (un anti-HA o anti-poli-His). A continuación se hicieron tres lavados de 5 min en agitación y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) por 1h. Para el caso de las His-proteínas el anticuerpo primario anti-poli-His se encuentra acoplado a HRP, por tanto no fue necesario el anticuerpo secundario. Por último se hicieron nuevamente tres lavados de 5min en agitación y la detección se hizo por ECL. Las imágenes del array fueron escaneadas y procesadas mediante el programa *Array Analyze* que proporciona el fabricante.

**Buffer TTBS 1X:** Tris-HCl pH7,4 [10mM], Tween 0,05% (v/v) y NaCl [150mM].

**Solución de bloqueo:** Buffer TTBS 1X y leche 5%.



## RESULTADOS



## RESULTADOS

### I. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN EN CÉLULAS SILENCIADAS PARA CHD6

#### I.1 Silenciamiento de CHD6 en células HEK293T

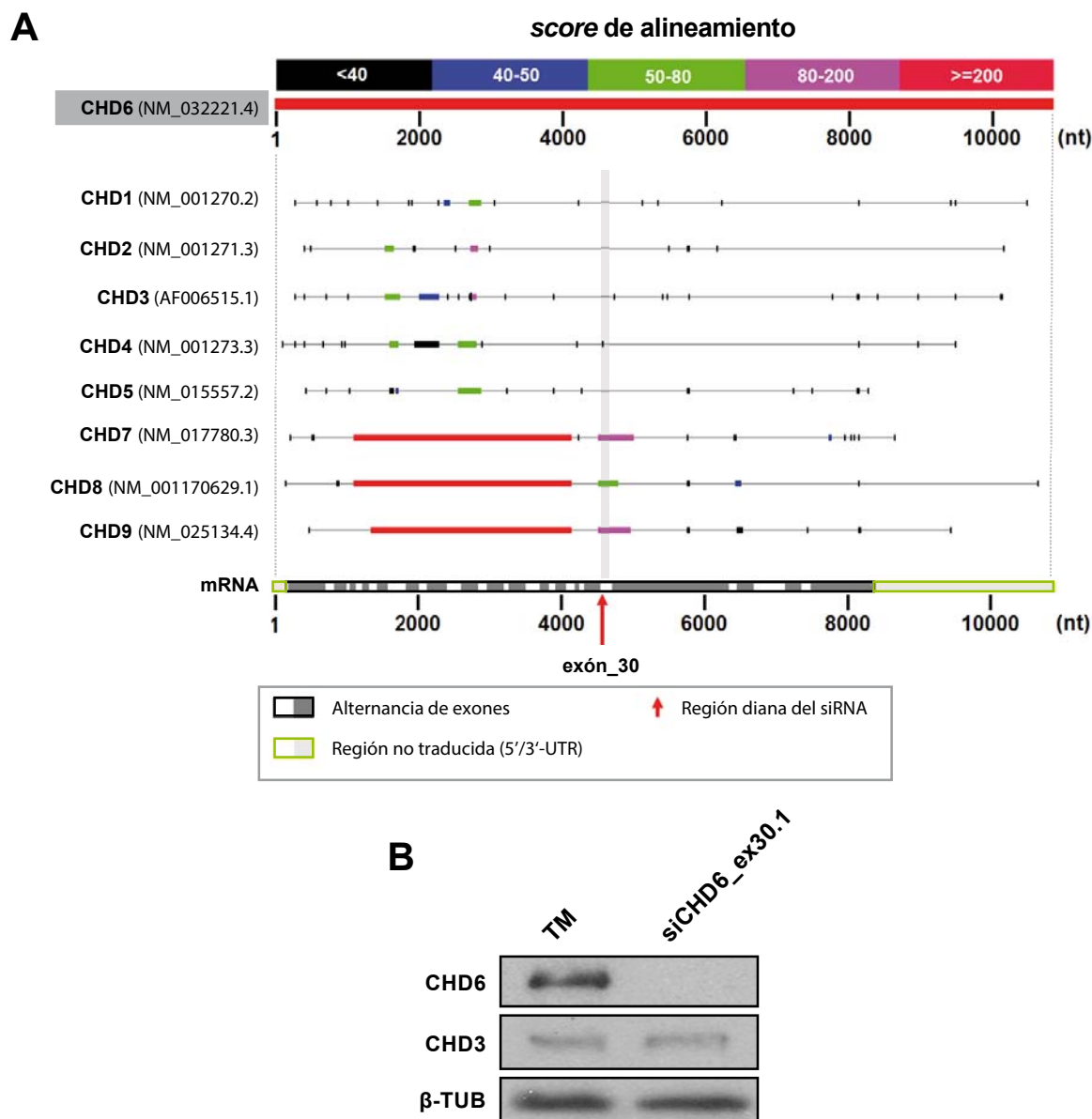
Para abordar el silenciamiento de la proteína CHD6 recurrimos a la utilización de la técnica de RNA interferente (RNAi) basado en un plásmido pSuper.retro.puro (Oligoengine) que dirige la expresión intracelular de transcritos siRNA-like (*short hairpin* RNA o shRNA) y que ha demostrado ser una herramienta poderosa para lograr un silenciamiento efectivo y específico, que se mantiene de manera estable y persistente, siempre y cuando la reducción de la proteína en estudio, no comprometa la viabilidad de las células.

Para ello, se transfectaron células HEK293T con dos construcciones: 1) un plásmido de silenciamiento de CHD6 cuya secuencia diana se corresponde con una región de baja similitud de secuencia en otros miembros de la familia CHD, localizada en el exón 30 de CHD6 (siCHD6\_ex30) y que ha sido descrita previamente en nuestro laboratorio (Alfonso et al., 2011)(**Figura R1-A**) y 2) un plásmido control (TM) que expresa un shRNA que no tiene homología con ningún mensajero celular humano (Rodríguez, 2009). 48 h post-transfección se obtuvieron los extractos de proteína y se analizaron mediante ensayos de *Western-blot*, utilizando un anticuerpo anti-CHD6 y anti- $\beta$ -tubulina como control de carga. La misma membrana se utilizó para comprobar la especificidad de silenciamiento frente otro miembro de la familia CHD, usando un anticuerpo antiCHD3.

Como se puede observar en la **figura R1-B**, el nivel de proteína CHD6 de las células silenciadas es claramente inferior (80-90%) al nivel que se observa en las células transfectadas con el plásmido control TM. También se observa que los niveles de la proteína CHD3 no se ven afectados en las células silenciadas para CHD6.

#### I.2 El silenciamiento de CHD6 induce una expresión diferencial de genes

Comprobado el silenciamiento de CHD6, se decidió estudiar el perfil de expresión global de los genes celulares, tanto en condiciones de silenciamiento de CHD6 (siCHD6\_ex30.1) como en condiciones basales (TM) para identificar genes diferencialmente expresados (GDE's) en células HEK293T. Para ello, se aisló el RNA total de las células transfectadas con el silenciador siCHD6\_ex30.1 o con TM, 48h post-transfección y se procesó para su análisis mediante un ensayo de *microarray* de DNA según lo descrito en Materiales y Métodos.



**Figura R1. Silenciamiento específico de CHD6 en células HEK293T.**

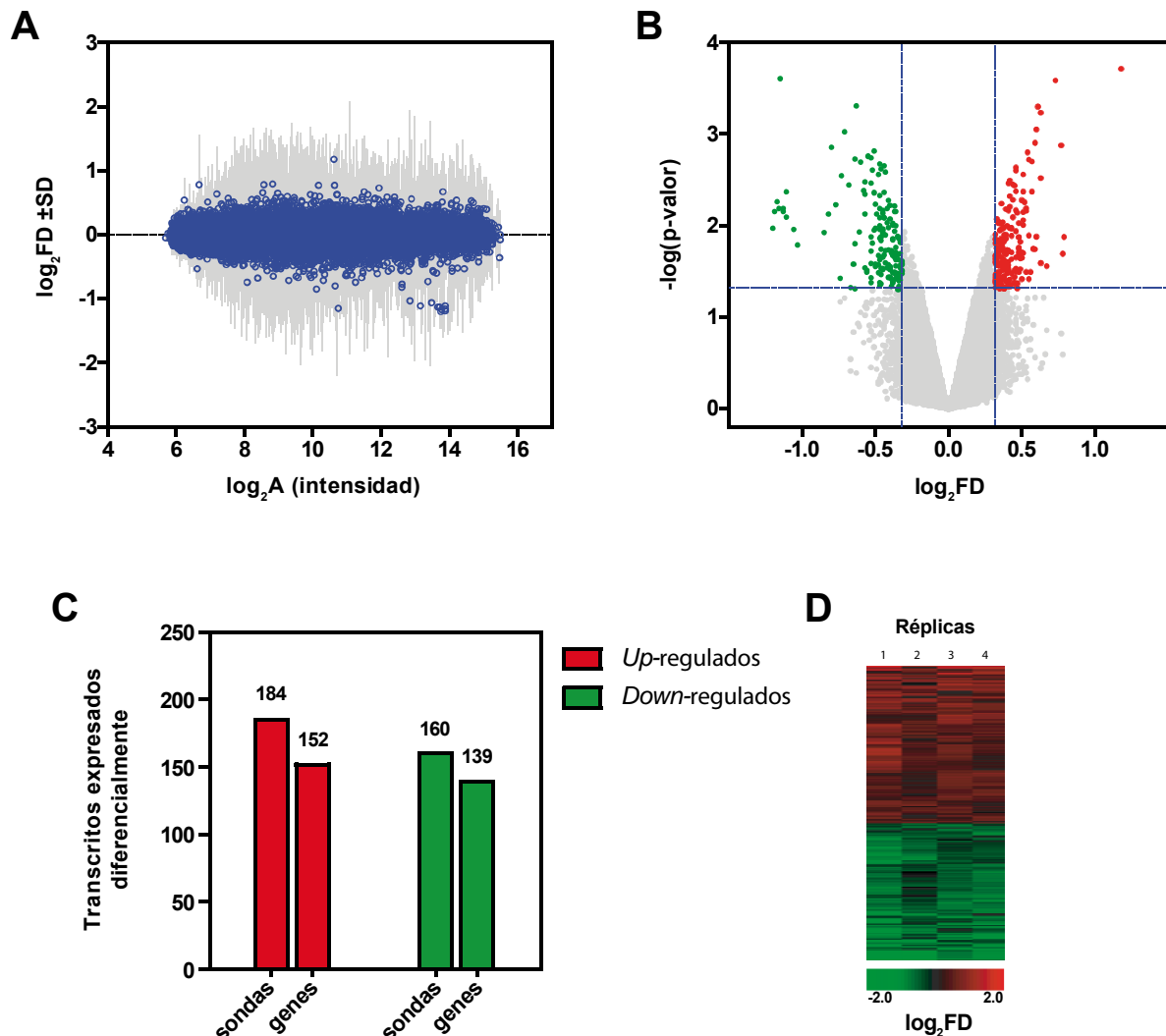
(A) Alineamiento de secuencias del mRNA para los distintos miembros de la familia CHD en el que se muestra la región diana elegida (banda vertical gris) para silenciar CHD6 y que corresponde al exón 30 de CHD6 (flecha roja). (B) Análisis de *Western-Blot* de extractos totales de células HEK293T 48h post-transfección con el silenciador de CHD6 (siCHD6\_ex30.1) y con el silenciador control (TM) en el que se observa una reducción en los niveles de proteína de CHD6 ( $\alpha$ -CHD6) y no en los niveles de otro miembro de la familia CHD ( $\alpha$ -CHD3).

El objetivo tras hacer un análisis de *microarrays* fue producir una lista de genes diferencialmente expresados, que pudiera ser sujeto de ser anotada con información útil que explicara la función de el/los conjunto(s) de genes, mediante la ontología génica. En términos generales, este análisis involucró una serie de pasos, tales como la lectura de los datos en bruto, la evaluación de la calidad de estos, la eliminación de puntos incorrectos y finalmente el cálculo de la expresión diferencial por análisis estadístico (ver en detalle el apartado de análisis bioinformático en Materiales y Métodos).

En la **figura R2-A**, se muestran los datos obtenidos mediante un gráfico de tipo MA, que representa la expresión diferencial de siCHD6\_ex30.1/TM en escala Log2 (M) versus la intensidad de expresión (A), tras haber hecho la normalización dentro de cada *array* y entre *arrays*, minimizando de esta forma los sesgos sistemáticos producidos por las diferencias en el acoplamiento al colorante y a las distintas eficiencias de hibridación. Como es de esperar, la mayoría de los genes no muestran una expresión diferencial pues la nube de puntos se encuentran en torno a cero, existiendo puntos que claramente se salen de la nube y que representaría los genes diferencialmente expresados.

Una vez normalizados los datos, se realizó un análisis estadístico para evaluar la significancia de la expresión diferencial por medio del paquete LiMMA y se visualizó por medio de un gráfico de volcán (**Figura R2-B**), el cual combina el nivel de significancia estadística y las veces de cambio de los genes respecto al control TM. Se consideraron regulados de forma diferencial aquellos genes que tuvieran un valor de  $p \leq 0.05$  y un cambio positivo o negativo de 1,24 veces. De esta forma se obtuvieron 152 genes *up*-regulados y 139 genes *down*-regulados (**Figura R2-C**) que representan el ~0,8% del total de transcritos analizados del microarray. En la **Tabla 1**, se presenta una lista completa de transcritos (genes y ESTs) alterados en células HEK293T silenciadas para CHD6.

En la **figura R2-D** se representa el *heat-map* obtenido en el que se muestra el perfil de expresión obtenido para las 4 réplicas experimentales, en el que se aprecia la similitud entre ellas, reflejando su significancia estadística.



**Figura R2. Análisis de expresión diferencial en células silenciadas para CHD6.**

(A) Gráfico MA, que muestra en el eje “y” los valores promedio ( $n=4$ ) corregidos y normalizados de *Fold change* (siCHD6\_30/TM) y en el eje “x” los valores promedio de la intensidad de expresión para el total de genes analizados (34K) (B) Gráfico de volcán que muestra la selección de genes expresados diferencialmente de forma significativa ( $p\text{-valor}<0.05$ ), los puntos en rojo representan los genes *up-regulados* ( $FD>1.25$ ) mientras que los puntos en verde representan los genes *down-regulados* ( $FD<-1.25$ ) (C) Número total de sondas y genes diferencialmente expresados (D) *Heat-map*, que muestra el grado de expresión en los dos grupos de genes diferencialmente expresados (*up-* y *down-*) y entre las distintas réplicas biológicas. Dado que sólo se tiene una condición experimental (silenciamiento a 48h post-transfección, no se pudo realizar un análisis de agrupamiento para la determinación de grupos de genes coexpresados.

Tabla 1. Lista de genes regulados por CHD6

N	ID Sonda	GEN	DESCRIPCIÓN	P-V.	FD
<b>Genes up-regulados</b>					
1	XR_426754		PREDICTED: neurogenic locus notch homolog protein 2-like misc_RNA LOC101929796	1.9e-4	2.27
1	NM_001017915	INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase 145kDa transcript variant 1	1.3e-2	1.73
1	TCONS_00015713		AL356953 leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6 partial (4%)	2.0e-2	1.72
1	NM_004864	GDF15	growth differentiation factor 15	1.3e-3	1.71
1	NM_019593	GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2.6e-4	1.65
1	NM_022121	PERP	PERP TP53 apoptosis effector	2.8e-2	1.59
3	NM_001554	CYR61	cysteine-rich angiogenic inducer 61	3.0e-3	1.55
2	NM_000276	OCRL	oculocerebrorenal syndrome of Lowe transcript variant A	2.6e-2	1.55
1	NM_020734	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK-like family member B	5.8e-4	1.54
1	NM_182760	SUMF1	sulfatase modifying factor 1 transcript variant 1	5.0e-4	1.53
1	NM_006509	RELB	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	1.3e-2	1.52
2	NM_198400	NEDD4	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 2	8.9e-4	1.51
1	NM_006472	TXNIP	thioredoxin interacting protein	1.8e-2	1.51
3	NM_001554	CYR61	cysteine-rich angiogenic inducer 61	1.2e-3	1.50
1	NM_002045	GAP43	growth associated protein 43 transcript variant 2	1.8e-2	1.49
1	NM_001134745	LRRTM4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4 transcript variant 1	4.2e-3	1.49
1	NM_005708	GPC6	glypican 6	3.2e-2	1.48
1	THC2783023		Q8IUM9_HUMAN (Q8IUM9) ACSL3 protein complete	2.0e-3	1.48
2	NM_152278	TCEAL7	transcription elongation factor A	1.3e-2	1.47
1	NM_000158	GBE1	glucan branching enzyme 1	1.9e-3	1.46
1	NM_018557	LRP1B	low density lipoprotein receptor-related protein 1B	3.9e-2	1.46
3	NM_001554	CYR61	cysteine-rich angiogenic inducer 61	6.9e-3	1.45
1	NM_001145340	MDM2	MDM2 oncogene E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 4	3.2e-2	1.45
1	NM_016836	RBMS1	RNA binding motif single stranded interacting protein 1 transcript variant 1	1.6e-3	1.45
2	NM_024331	TTPAL	tocopherol transcript variant 1	6.5e-3	1.45
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	2.0e-2	1.43
1	NM_024594	PANK3	pantothenate kinase 3	9.9e-3	1.43
1	NM_001085400	RELL1	RELT-like 1 transcript variant 1	5.5e-3	1.43
2	NM_014584	ERO1L	ERO1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	4.2e-3	1.42
2	NM_198400	NEDD4	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 2	8.7e-3	1.42
1	NM_016836	RBMS1	RNA binding motif single stranded interacting protein 1 transcript variant 1	7.1e-3	1.42
3	NM_018452	TMEM242	transmembrane protein 242	2.8e-3	1.42
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	2.0e-2	1.41
1	NM_014394	GHITM	growth hormone inducible transmembrane protein	3.0e-2	1.41
1	NM_203458	NOTCH2NL	notch 2 N-terminal like	3.9e-2	1.41
1	NM_012241	SIRT5	sirtuin 5 transcript variant 1	2.3e-2	1.41
1	NM_001190766	STMND1	stathmin domain containing 1	5.3e-3	1.41
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	1.5e-2	1.40
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	1.4e-2	1.40
1	NM_024572	GALNT14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 transcript variant 1	2.2e-2	1.40
1	NM_000345	SNCA	synuclein alpha transcript variant 1	1.7e-2	1.40
1	NM_006307	SRPX	sushi-repeat containing protein X-linked transcript variant 1	2.3e-2	1.40
1	A_24_P367259		unknown	9.4e-3	1.40
2	NM_020299	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1 member B10	1.3e-2	1.39
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	4.9e-2	1.39
1	ENST00000314088	HIST1H2AC	histone cluster 1 H2Ac	7.2e-3	1.39
1	NM_182734	PLCB1	phospholipase C beta 1 transcript variant 2	1.8e-2	1.39
1	NM_006404	PROCR	protein C receptor endothelial	2.0e-2	1.39
1	NM_021111	RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	3.2e-2	1.39
4	NM_002119	HLA-DOA	major histocompatibility complex class II DO alpha	2.9e-2	1.38
2	NM_016245	HSD17B11	hydroxysteroid	1.1e-2	1.38
2	NM_016258	YTHDF2	YTH domain family member 2 transcript variant 1	4.2e-3	1.38
2	A_32_P53260		unknown	4.3e-2	1.38
2	NM_020299	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1 member B10	3.1e-2	1.37
1	NM_032621	BEX2	brain expressed X-linked 2 transcript variant 3	6.8e-3	1.37
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	2.5e-3	1.37
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	2.2e-2	1.37
2	NM_004428	EFNA1	ephrin-A1 transcript variant 1	2.3e-3	1.37
3	NM_203505	G3BP2	GTPase activating protein transcript variant 1	4.3e-2	1.37
1	NM_003541	HIST1H4K	histone cluster 1 H4k	3.2e-2	1.37
1	ENST00000420759		PREDICTED: uncharacterized LOC101927293 ncRNA	4.2e-2	1.37
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	3.5e-3	1.36
1	NM_032048	EMILIN2	elastin microfibril interfacer 2	3.7e-3	1.36
1	ENST00000395686	ERO1L	ERO1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	8.1e-3	1.36
1	ENST00000342294	TRA2B	transformer 2 beta homolog ( <i>Drosophila</i> )	3.6e-2	1.36
2	NM_001645	APOC1	apolipoprotein C-I	1.1e-2	1.35
1	NM_013238	DNAJC15	DnaJ	2.0e-2	1.35
2	NM_144573	NEXN	nexilin transcript variant 1	5.2e-3	1.35
1	NM_000317	PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	3.4e-2	1.35
2	NM_017798	YTHDF1	YTH domain family member 1	1.1e-2	1.35
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	2.3e-2	1.34
1	BX647410	FAM13A	mRNA; cDNA DKFZp686O13152	4.5e-2	1.34
2	NM_016358	IRX4	iroquois homeobox 4 transcript variant 5	4.8e-3	1.34
1	NM_015436	RCHY1	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1 E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 1	6.2e-3	1.34
1	NM_002909	REG1A	regenerating islet-derived 1 alpha	3.2e-3	1.34
1	NM_005012	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 transcript variant 1	1.1e-2	1.34
2	NM_016258	YTHDF2	YTH domain family member 2 transcript variant 1	1.3e-2	1.34
3	NM_033160	ZNF658	zinc finger protein 658	4.6e-2	1.34
1	NM_020685	C3orf14	chromosome 3 open reading frame 14 transcript variant 1	3.1e-2	1.33
1	NM_138375	CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 transcript variant 1	3.9e-2	1.33
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	3.5e-3	1.33
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	6.5e-3	1.33
2	NM_012395	CDK14	cyclin-dependent kinase 14 transcript variant 2	4.0e-2	1.33
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	4.5e-2	1.33
4	NM_030940	ISCA1	iron-sulfur cluster assembly 1	2.5e-2	1.33
1	XM_005276006		PREDICTED: uncharacterized LOC101930586 mRNA	4.2e-2	1.33
2	NM_014435	NAAA	N-acyl ethanolamine acid amidase transcript variant 1	6.9e-3	1.33
1	NM_006206	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor alpha polypeptide	3.2e-2	1.33
2	NM_004650	PNPLA4	patatin-like phospholipase domain containing 4 transcript variant 1	2.7e-2	1.33
2	NM_152278	TCEAL7	transcription elongation factor A	3.0e-2	1.33
2	NM_024331	TTPAL	tocopherol transcript variant 1	1.9e-2	1.33
2	ENST00000371937	ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	1.0e-2	1.32

## RESULTADOS

N	ID Sonda	GEN	DESCRIPCIÓN	P-V.	FD
Genes up-regulados (cont.)					
11	NM_080801	COL13A1	collagen type XIII alpha 1 transcript variant 5	3.3e-2	1.32
2	NM_020367	PARP11	poly transcript variant 1	1.9e-2	1.32
3	NM_005399	PRKAB2	protein kinase AMP-activated beta 2 non-catalytic subunit transcript variant 1	2.0e-2	1.32
1	NM_001172700	SHROOM1	shroom family member 1 transcript variant 1	4.7e-2	1.32
1	NM_015204	THSD7A	thrombospondin type I domain containing 7A	1.9e-2	1.32
1	NM_000700	ANXA1	annexin A1	1.3e-2	1.31
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	2.1e-2	1.31
1	NM_001100624	CENPN	centromere protein N transcript variant 2	6.6e-3	1.31
1	NR_034095	LINC01197	long intergenic non-protein coding RNA 1197 long non-coding RNA	1.3e-2	1.31
2	NM_005928	MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein transcript variant 1	2.6e-2	1.31
1	S71020	S71020	THRA1/BTR=fusion gene (3' region deletion/fusion rearrangement)	3.0e-2	1.31
2	NM_021109	TMSB4X	thymosin beta 4 X-linked	2.4e-2	1.31
1	NM_145725	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3 transcript variant 1	1.4e-2	1.31
1	A_32_P99804		unknown	4.0e-2	1.31
10	NM_001124	ADM	adrenomedullin	3.5e-2	1.30
10	NM_001124	ADM	adrenomedullin	4.9e-2	1.30
1	NM_016201	AMOTL2	angiomin like 2 transcript variant 2	2.0e-2	1.30
10	NM_000043	FAS	Fas cell surface death receptor transcript variant 1	1.1e-2	1.30
10	NM_000043	FAS	Fas cell surface death receptor transcript variant 1	2.5e-2	1.30
2	NM_019593	GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.0e-2	1.30
1	NM_002211	ITGB1	integrin beta 1 transcript variant 1A	1.5e-2	1.30
1	NR_075071	LRRC9	leucine rich repeat containing 9 non-coding RNA	3.7e-2	1.30
1	NM_005086	SSPN	sarcospan transcript variant 1	2.8e-2	1.30
1	NR_002330	ST7-AS1	ST7 antisense RNA 1 antisense RNA	3.0e-2	1.30
1	NM_022093	TNN	tenascin N	4.9e-2	1.30
3	NM_001025616	ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24 transcript variant 1	3.0e-2	1.29
1	NM_006684	CFHR4	complement factor H-related 4 transcript variant 3	1.7e-2	1.29
1	NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3 transcript variant 5	9.2e-3	1.29
1	NM_007197	FZD10	frizzled class receptor 10	1.4e-2	1.29
1	NM_018192	LEPREL1	leprecan-like 1 transcript variant 1	5.8e-3	1.29
1	NM_199461	NANOS1	nanos homolog 1	1.5e-2	1.29
3	NM_181354	OXR1	oxidation resistance 1 transcript variant 2	3.7e-2	1.29
1	NM_148674	SMC1B	structural maintenance of chromosomes 1B transcript variant 1	1.6e-2	1.29
1	NR_038453	UNC5B-AS1	UNC5B antisense RNA 1 long non-coding RNA	4.7e-2	1.29
3	NM_033160	ZNF658	zinc finger protein 658	1.8e-2	1.29
1	BM807051		AGENCOURT_6552906 NIH_MGC_85 cDNA clone IMAGE:5552012 5' mRNA sequence	1.1e-2	1.29
1	THC2577566		unknown	2.7e-2	1.29
1	THC2707492		unknown	2.7e-2	1.29
10	NM_001124	ADM	adrenomedullin	4.0e-2	1.28
2	NM_152400	C4orf32	chromosome 4 open reading frame 32	1.6e-2	1.28
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	2.2e-2	1.28
1	NM_153696	FOLH1B	folate hydrolase 1B	1.7e-2	1.28
2	NM_078474	TM2D3	TM2 domain containing 3 transcript variant 1	2.5e-2	1.28
2	NM_018264	TYW1	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	4.5e-2	1.28
1	NM_019050	USP53	ubiquitin specific peptidase 53	9.5e-3	1.28
1	TCONS_12_00014098		BROAD Institute lincRNA lincRNA XLOC_014512	1.9e-2	1.28
1	NM_144689	ZNF420	zinc finger protein 420	1.1e-2	1.28
1	THC2575678		Q753E4_ASHGO (Q753E4) AFR372Wp partial (3%)	4.4e-2	1.28
10	NM_001124	ADM	adrenomedullin	2.7e-2	1.27
1	NM_019048	ASNSD1	asparagine synthetase domain containing 1	3.2e-2	1.27
10	NM_000610	CD44	CD44 molecule transcript variant 1	1.1e-2	1.27
1	NM_006208	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	1.5e-2	1.27
10	NM_000043	FAS	Fas cell surface death receptor transcript variant 1	9.4e-3	1.27
2	NR_026975	FIRRE	fire intergenic repeating RNA element long non-coding RNA	3.2e-2	1.27
2	NM_002053	GBP1	guanylate binding protein 1 interferon-inducible	4.5e-2	1.27
2	NM_002166	ID2	inhibitor of DNA binding 2 dominant negative helix-loop-helix protein	2.1e-2	1.27
2	NM_053036	NPFFR2	neuropeptide FF receptor 2 transcript variant 2	1.4e-2	1.27
1	NM_138364	PRMT9	protein arginine methyltransferase 9	3.6e-2	1.27
1	NM_001194986	TRABD2B	TraB domain containing 2B	2.8e-2	1.27
1	B0031574		602299712F1 NIH_MGC_87 cDNA clone IMAGE:4394138 5' mRNA sequence	9.4e-3	1.27
1	THC2755433		unknown	4.9e-2	1.27
1	ENST00000482713	BOD1L1	biorientation of chromosomes in cell division 1-like 1	3.3e-2	1.26
10	NM_000043	FAS	Fas cell surface death receptor transcript variant 1	1.8e-2	1.26
1	NM_015714	G0S2	G0/G1 switch 2	2.0e-2	1.26
1	NM_002165	ID1	inhibitor of DNA binding 1 dominant negative helix-loop-helix protein transcript variant 1	9.0e-3	1.26
1	NM_152778	MFSB8	major facilitator superfamily domain containing 8	4.0e-2	1.26
1	NM_173362	RFESD	Rieske transcript variant 2	2.1e-2	1.26
2	NM_207113	SLC37A3	solute carrier family 37 member 3 transcript variant 1	1.8e-2	1.26
2	NM_001005291	SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1 transcript variant 1	3.3e-2	1.26
1	NM_000361	THBD	thrombomodulin	2.1e-2	1.26
1	NM_182976	ZNF326	zinc finger protein 326 transcript variant 1	2.6e-2	1.26
1	THC2672083		Q9NY18_HUMAN (Q9NY18) Calcium channel alpha2-delta3 subunit partial (32%)	2.4e-2	1.26
2	NM_001025077	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2 transcript variant 3	4.0e-2	1.25
1	ENST00000606080	FRK	fyn-related kinase	4.1e-2	1.25
2	NM_033060	KRTAP4-1	keratin associated protein 4-1	8.5e-3	1.25
2	NM_053036	NPFFR2	neuropeptide FF receptor 2 transcript variant 2	3.7e-2	1.25
3	NM_014028	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	2.4e-2	1.25
2	NM_032918	RERG	RAS-like estrogen-regulated growth inhibitor transcript variant 1	4.7e-2	1.25
3	NM_031469	SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamate-rich protein like 2	1.6e-2	1.25
2	NM_003167	SULT2A1	sulfotransferase family cytosolic 2A dehydroepiandrosterone	2.5e-2	1.25
1	NM_001561	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	2.7e-2	1.25
1	NM_145803	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6 E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 1	1.4e-2	1.25
10	NM_001017535	VDR	vitamin D transcript variant 2	2.1e-2	1.25
1	NM_153251	ZDHHC20	zinc finger DHHC-type containing 20 transcript variant 1	3.8e-2	1.25
1	NM_152791	ZNF555	zinc finger protein 555 transcript variant 1	1.3e-2	1.25
1	A_24_P170357		unknown	3.4e-2	1.25
1	THC2507433		Q5TD55_HUMAN partial (71%)	4.2e-2	1.25
1	THC2633136		Q9F8M7_CARHY partial (11%)	2.5e-2	1.25
4	NM_015891	CDC40	cell division cycle 40	2.3e-2	1.24
1	NM_012242	DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	1.4e-2	1.24
1	NM_031939	MRO	maestro transcript variant 1	2.2e-2	1.24



N	ID SONDA	GEN	DESCRIPCIÓN	P-V.	FD
Genes down-regulados					
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.1e-2	-2.30
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	7.0e-3	-2.28
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	5.5e-3	-2.25
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	6.5e-3	-2.23
2	NM_032221	CHD6	chromodomain helicase DNA binding protein 6	2.5e-4	-2.22
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	7.0e-3	-2.20
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	6.5e-3	-2.19
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	4.3e-3	-2.17
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	8.0e-3	-2.16
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.1e-2	-2.08
10	NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.6e-2	-2.05
2	NM_016530	RAB8B	RAB8B member RAS oncogene family	1.2e-2	-1.80
1	NM_002155	HSPA6	heat shock 70kDa protein 6	7.5e-3	-1.76
2	NM_030926	ITM2C	integral membrane protein 2C transcript variant 1	1.4e-3	-1.74
1	NM_003616	GEMIN2	gem transcript variant alpha	5.9e-3	-1.71
1	NM_173642	RIMKLA	ribosomal modification protein rimK-like family member A	3.8e-2	-1.67
1	NM_018060	IARS2	isoleucyl-tRNA synthetase 2 mitochondrial	2.8e-3	-1.66
4	NM_032932	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4	9.5e-4	-1.63
1	NM_130810	DYX1C1	dyslexia susceptibility 1 candidate 1 transcript variant 1	3.6e-3	-1.60
2	NM_012333	MYCBP	MYC binding protein transcript variant 1	4.8e-2	-1.59
1	XR_171390		PREDICTED: uncharacterized LOC100287063 misc_RNA	2.6e-2	-1.57
1	NM_033426	CIPC	CLOCK-interacting pacemaker	4.9e-2	-1.56
2	NM_001002860	BTBD7	BTB transcript variant 1	1.6e-2	-1.55
1	NM_152391	POLC3	PQ loop repeat containing 3 transcript variant 1	1.9e-3	-1.55
2	NM_012333	MYCBP	MYC binding protein transcript variant 1	4.9e-4	-1.54
4	NM_020240	CDC42SE2	CDC42 small effector 2 transcript variant 1	1.2e-2	-1.53
1	ENST00000228741	ELK3	ELK3 ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	2.0e-3	-1.51
1	NM_002572	PAFAH1B2	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 2 transcript variant 1	4.2e-3	-1.50
1	NM_021132	PPP3CB	protein phosphatase 3 catalytic subunit beta isozyme transcript variant 2	7.4e-3	-1.49
3	NM_144567	ANGEL2	angel homolog 2	3.1e-2	-1.48
1	NM_015554	GLCE	glucuronic acid epimerase	4.5e-3	-1.48
3	NM_016322	RAB14	RAB14 member RAS oncogene family	2.9e-2	-1.48
2	NM_052932	TMEM123	transmembrane protein 123	3.3e-3	-1.48
1	NM_022491	SUDS3	suppressor of defective silencing 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	3.2e-2	-1.47
1	NM_182543	NSUN6	NOP2/Sun domain family member 6	1.7e-3	-1.46
3	NM_144567	ANGEL2	angel homolog 2	1.8e-3	-1.45
1	NM_002758	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	3.4e-3	-1.45
1	NM_015652	C10orf12	chromosome 10 open reading frame 12	1.9e-2	-1.44
3	NM_145808	MTPN	myotrophin	2.6e-2	-1.44
2	NM_020182	PMEP1A	prostate transmembrane protein androgen induced 1 transcript variant 1	3.7e-2	-1.44
2	NM_014765	TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog	2.5e-3	-1.44
2	NM_032175	UTP15	UTP15 U3 small nucleolar ribonucleoprotein homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) transcript variant 1	4.2e-2	-1.44
2	NM_024646	ZYG11B	zyg-11 family member B cell cycle regulator	1.3e-2	-1.44
1	NM_003051	SLC16A1	solute carrier family 16 member 1 transcript variant 1	1.6e-2	-1.43
1	XM_005268677	C12orf66	PREDICTED: chromosome 12 open reading frame 66 transcript variant X1 mRNA	1.5e-3	-1.42
3	NM_203391	GK	glycerol kinase transcript variant 1	4.4e-3	-1.42
1	NM_003819	PABPC4	poly transcript variant 2	1.1e-2	-1.42
2	NM_021222	PRUNE	prune exopolyphosphatase	1.1e-2	-1.42
3	NM_175623	RAB31P	RAB3A interacting protein transcript variant alpha 2	2.6e-2	-1.42
1	NM_012080	HDHD1	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1 transcript variant 2	2.8e-2	-1.41
2	NM_004869	VPS4B	vacuolar protein sorting 4 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	5.8e-3	-1.41
1	NM_018375	SLC39A9	solute carrier family 39 member 9 transcript variant 1	3.3e-2	-1.40
1	NM_001017395	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1 transcript variant 1	7.5e-3	-1.40
1	ENST00000560141	TRIM69	tripartite motif containing 69	2.7e-2	-1.40
1	NM_013352	DSE	dermatan sulfate epimerase transcript variant 1	8.2e-3	-1.39
2	NM_006464	TGOLN2	trans-golgi network protein 2 transcript variant 1	2.1e-2	-1.39
1	ENST00000568559	TMEM170A	transmembrane protein 170A	1.1e-2	-1.39
2	NM_013390	TMEM2	transmembrane protein 2 transcript variant 1	2.8e-3	-1.39
1	A_24_P409816		unknown	6.5e-3	-1.39
1	ENST00000588041		cDNA clone IMAGE:5263455	4.2e-2	-1.39
2	NM_005759	ABI2	abl-interactor 2 transcript variant 3	2.1e-3	-1.38
3	NM_001005353	AK4	adenylate kinase 4 transcript variant 1	4.3e-2	-1.38
1	NM_017946	FKBP14	FK506 binding protein 14 22 kDa transcript variant 1	4.7e-3	-1.38
2	NM_018178	GOLPH3L	golgi phosphoprotein 3-like	4.6e-2	-1.38
4	NM_006037	HDAC4	histone deacetylase 4	3.4e-2	-1.38
1	NM_002417	MKI67	marker of proliferation Ki-67 transcript variant 1	1.3e-2	-1.38
1	NM_020662	MRS2	MRS2 magnesium transporter transcript variant 2	2.4e-2	-1.38
2	NM_024664	PPCS	phosphopantothenoylcysteine synthetase transcript variant 1	1.3e-2	-1.38
3	NM_015355	SUZ12	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	1.4e-2	-1.38
1	NM_014506	TOR1B	torsin family 1 member B	1.4e-2	-1.38
2	NM_015306	USP24	ubiquitin specific peptidase 24	1.0e-2	-1.38
3	NM_024646	ZYG11B	zyg-11 family member B cell cycle regulator	2.9e-2	-1.38
2	NM_006628	ARPP19	cAMP-regulated phosphoprotein 19kDa	6.8e-3	-1.37
1	NM_020154	EMC7	ER membrane protein complex subunit 7	2.2e-2	-1.37
1	NM_004966	HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F transcript variant 3	3.0e-2	-1.37
1	NM_002436	MPP1	membrane protein palmitoylated 1 55kDa transcript variant 1	1.8e-2	-1.37
2	NM_024664	PPCS	phosphopantothenoylcysteine synthetase transcript variant 1	1.2e-2	-1.37
1	NM_152282	PXYLP1	2-phosphoxylase phosphatase 1 transcript variant 1	2.4e-3	-1.37
1	NM_001008495	TMEM64	transmembrane protein 64 transcript variant 1	2.9e-2	-1.37
1	A_24_P920664		unknown	1.1e-2	-1.37
2	NM_022786	ARV1	ARV1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.1e-2	-1.36
1	NM_032466	ASPH	aspartate beta-hydroxylase transcript variant 3	2.1e-2	-1.36
1	NM_001184	ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related	2.2e-3	-1.36
1	NM_017546	CNOT11	CCR4-NOT transcription complex subunit 11	8.1e-3	-1.36
2	NM_016472	GSKIP	GSK3B interacting protein transcript variant 2	4.3e-3	-1.36
2	NM_032510	PARD6G	par-6 family cell polarity regulator gamma	1.2e-2	-1.36

## RESULTADOS

N	ID Sonda	GEN	DESCRIPCIÓN	P-V.	FD
Genes <i>down-regulados</i> (cont.)					
3	NM_001017395	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1 transcript variant 1	7.3e-3	-1.36
1	AK096415		cDNA FLJ39096 fis clone NTONG1000247	8.3e-3	-1.36
1	NM_201274	MPRIIP	myosin phosphatase Rho interacting protein transcript variant 2	1.9e-2	-1.35
1	BC013423		clone IMAGE:3892140 mRNA	2.6e-3	-1.35
2	NM_016952	CDON	cell adhesion associated oncogene regulated transcript variant 2	1.3e-2	-1.34
1	NM_152558	IQCE	IQ motif containing E transcript variant 1	9.4e-3	-1.34
1	ENST00000263726	LHX4	LIM homeobox 4	2.5e-2	-1.34
3	NM_025160	WDR26	WD repeat domain 26 transcript variant 1	2.9e-2	-1.34
1	NM_017742	ZCCHC2	zinc finger CCHC domain containing 2	6.5e-3	-1.34
1	NM_014908	DOLK	dolichol kinase	3.6e-2	-1.33
1	NM_020921	NIN	ninein transcript variant 2	3.7e-2	-1.33
1	NM_001198783	POU2F1	POU class 2 homeobox 1 transcript variant 2	5.3e-3	-1.33
1	NM_024632	SAP30L	SAP30-like transcript variant 1	1.9e-2	-1.33
3	NM_003898	SYNJ2	synaptotagmin 2 transcript variant 1	2.7e-2	-1.33
1	XR_424156		PREDICTED: uncharacterized LOC102724002 ncRNA	1.1e-2	-1.33
1	ENST00000341446	BRI3BP	BRI3 binding protein	3.0e-2	-1.32
2	NM_000522	HOXA13	homeobox A13	8.5e-3	-1.32
2	NM_003204	NFE2L1	nuclear factor erythroid 2-like 1	6.0e-3	-1.32
2	NM_138348	OTULIN	OTU deubiquitinase with linear linkage specificity	3.7e-2	-1.32
1	NM_015480	PVRL3	poliovirus receptor-related 3 transcript variant 1	2.9e-2	-1.32
1	NM_018126	TMEM33	transmembrane protein 33	2.8e-2	-1.32
1	NM_152641	ARID2	AT rich interactive domain 2	4.6e-2	-1.31
2	NM_006196	PCBP1	poly	3.8e-2	-1.31
2	NM_014904	RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2	2.0e-2	-1.31
1	A_32_P148199		unknown	1.9e-2	-1.31
1	NM_017421	COQ3	coenzyme Q3 methyltransferase	9.5e-3	-1.30
3	NM_018127	ELAC2	elaC ribonuclease Z 2 transcript variant 1	1.4e-2	-1.30
3	NM_203391	GK	glycerol kinase transcript variant 1	1.4e-2	-1.30
2	NM_018178	GOLPH3L	golgi phosphoprotein 3-like	3.3e-2	-1.30
3	NM_005324	H3F3B	H3 histone family 3B	4.2e-2	-1.30
2	NM_153371	LNK2	ligand of numb-protein X 2	9.9e-3	-1.30
1	NM_130807	MOB3A	MOB kinase activator 3A	2.0e-2	-1.30
1	NM_001031680	RUNX3	runt-related transcription factor 3 transcript variant 1	4.2e-2	-1.30
1	NM_024745	SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	2.1e-2	-1.30
3	NM_001005353	AK4	adenylate kinase 4 transcript variant 1	7.0e-3	-1.29
2	NM_006380	APPBP2	amyloid beta precursor protein transcript variant 1	6.1e-3	-1.29
4	NM_012388	BLOC1S6	biogenesis of lysosomal organelles complex-1 subunit 6 pallidin	1.2e-2	-1.29
4	NM_006037	HDAC4	histone deacetylase 4	3.2e-2	-1.29
1	NM_001031713	MCUR1	mitochondrial calcium uniporter regulator 1	7.0e-3	-1.29
2	NM_012428	NPTN	neuroplastin transcript variant b	2.4e-2	-1.29
1	NM_053023	ZFP91	ZFP91 zinc finger protein transcript variant 1	2.2e-2	-1.29
1	AK023816		cDNA FLJ13754 fis clone PLACE3000362	3.5e-2	-1.29
2	NM_153207	AEBP2	AE binding protein 2 transcript variant 1	1.7e-2	-1.28
1	NM_001004065	AKAP2	A kinase transcript variant 1	2.7e-2	-1.28
1	NM_015492	C15orf39	chromosome 15 open reading frame 39	3.8e-2	-1.28
2	NM_016350	NIN	ninein transcript variant 6	3.3e-2	-1.28
1	NM_022780	RMND5A	required for meiotic nuclear division 5 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	2.0e-2	-1.28
1	NM_024063	SPATA5L1	spermatogenesis associated 5-like 1 transcript variant 1	1.0e-2	-1.28
2	NM_006070	TFG	TRK-fused gene transcript variant 1	2.1e-2	-1.28
2	NM_015144	ZCCHC14	zinc finger CCHC domain containing 14	5.0e-2	-1.28
1	NM_018584	CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	4.7e-2	-1.27
1	ENST00000264235	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	5.0e-2	-1.27
2	NR_047527	KGFLP1	fibroblast growth factor 7 pseudogene transcript variant 1 non-coding RNA	3.8e-2	-1.27
1	NM_153361	NIM1K	NIM1 serine/threonine protein kinase transcript variant 1	2.1e-2	-1.27
1	ENST00000373316	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	1.4e-2	-1.27
1	NM_001012761	RGMB	repulsive guidance molecule family member b	4.0e-2	-1.27
1	NM_003794	SNX4	sorting nexin 4 transcript variant 1	2.4e-2	-1.27
2	NM_181784	SPRED2	sprouty-related EVH1 domain containing 2 transcript variant 1	1.3e-2	-1.27
1	BC038355		clone IMAGE:3858719 mRNA	1.3e-2	-1.27
1	THC2674354		Q36LB5_MARHY (Q36LB5) Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases partial (8%)	4.6e-2	-1.27
1	NM_018089	ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1 transcript variant 1	2.0e-2	-1.26
4	NM_012388	BLOC1S6	biogenesis of lysosomal organelles complex-1 subunit 6 pallidin	3.5e-2	-1.26
1	NM_016221	DCTN4	dynactin 4 transcript variant 2	2.7e-2	-1.26
2	NM_022777	IFT22	intraflagellar transport 22 homolog transcript variant 1	1.3e-2	-1.26
1	NM_014982	PCNX	pecanex homolog	1.5e-2	-1.26
2	NM_133452	RAVER1	ribonucleoprotein PTB-binding 1	3.5e-2	-1.26
2	NM_000308	CTSA	cathepsin A transcript variant 1	3.9e-2	-1.25
2	NM_033296	MRFP1	Morf4 family associated protein 1 transcript variant 1	2.6e-2	-1.25
2	NM_138348	OTULIN	OTU deubiquitinase with linear linkage specificity	2.7e-2	-1.25
1	NM_015153	PHF3	PHD finger protein 3 transcript variant 1	2.9e-2	-1.25
2	NM_152617	RNF168	ring finger protein 168 E3 ubiquitin protein ligase	3.1e-2	-1.25
1	THC2652700		unknown	3.1e-2	-1.25
1	THC2694422		unknown	2.4e-2	-1.25
2	NM_138927	SON	SON DNA binding protein transcript variant f	3.3e-2	-1.24

### I.3 Procesos biológicos enriquecidos en genes regulados por CHD6. La regulación negativa de la transcripción por RNAP II, regulación negativa del ciclo celular y remodelación de la cromatina

#### – Genes *up*-regulados

Para evaluar la importancia biológica de CHD6, se realizó un análisis de la ontología de los genes *up*-/*down*- regulados por CHD6 mediante el uso del servidor web GenCodis (<http://genecodis.cnb.csic.es>), dentro de cuatro categorías: proceso biológico (BP), función molecular (MF), componente celular (CC) y rutas metabólicas (en la base de datos KEGG).

De un total de 184 y 160 transcritos o sondas *up*-/*down*-regulados por CHD6 respectivamente, 32 y 21 (20,4/17,3%) no mostraron ninguna anotación en cualquiera de las categorías analizadas (datos no mostrados).

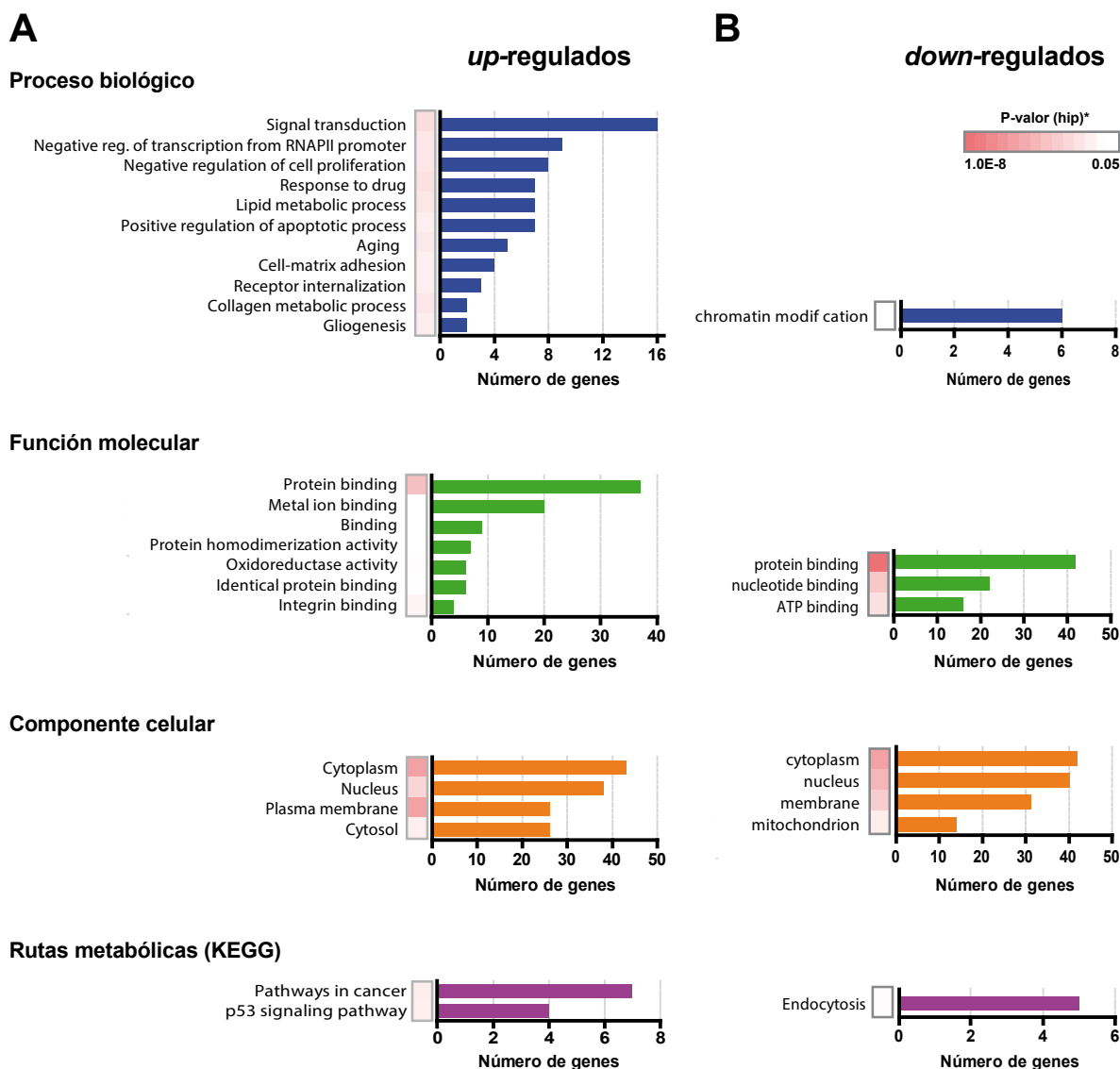
En la **figura R3-A**, donde se representan las categorías de procesos biológicos se observa que las anotaciones enriquecidas mayoritarias están involucradas en, transducción de señales regulación negativa de la transcripción por la RNAP II, regulación negativa de proliferación celular, regulación positiva de procesos apoptóticos, metabolismo de lípidos y respuesta a drogas. Por otra parte las funciones moleculares enriquecidas mayoritarias tienen que ver con la unión de proteínas y la unión a iones metálicos. En la categoría de componente celular, se observó una cantidad similar de genes enriquecidos tanto en citoplasma como en el núcleo y una cantidad considerable de genes en membrana plasmática. Por último, vemos que las rutas metabólicas involucradas en cáncer y señalización de p53 se encuentran enriquecidas en genes *up*-regulados por CHD6.

#### – Genes *down*-regulados

En lo que respecta a los genes *down*-regulados por CHD6, se aprecia claramente que la cantidad de anotaciones enriquecidas es menor a la obtenida en los *up*-regulados. De esta forma el único proceso biológico enriquecido significativamente es la modificación de la cromatina (**figura R3-B**). Entre las anotaciones enriquecidas de función molecular al igual que en genes *up*-regulados está la unión a proteínas, sin embargo también se encuentra la unión a nucleótidos y en particular a ATP, que es consistente con el hecho de que tanto CHD6 así como otros remodeladores de cromatina y enzimas modificadoras de cromatina sean dependientes de ATP. Respecto al componente celular, vemos que los genes *down*-regulados a diferencia de los *up*-regulados, están enriquecidos en mitocondria. De forma detallada en la **figura suplementaria RS1**, se muestran los genes regulados tanto *up*- como *down*-regulados para cada uno de los GO enriquecidos, ordenados en función del número de genes que están anotados en el GO correspondiente.



Anotaciones biológicas enriquecidas de genes regulados en células silenciadas para CHD6



**Figura R3. Análisis de ontología genética.**

Para la generación de este análisis mediante el programa *GenCodis* tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos (ver pág.) se utilizaron las siguientes listas de genes significativamente expresados en células silenciadas para CHD6: **(A)** 152 genes *up-regulados* con un  $FD > 1.25$ . **(B)** 139 genes *down-regulados* y un  $FD < -1.25$ . Tanto para (A) y (B) se incluyeron aquellas anotaciones que estuvieran enriquecidas con al menos 2 genes y una significancia de  $p < 0.05$ .

### I.4 Factores de transcripción regulados por CHD6

De los 291 genes expresados diferencialmente por CHD6, 26 (8,3%) genes se identificaron como factores o cofactores de transcripción mediante el uso del programa Genomatix, de los cuales algunos de ellos se encuentran enriquecidos en más de alguna anotación biológica (**Tabla 2**). Algunas de las anotaciones comunes a todos ellos son: la regulación de la transcripción por la RNAP II, la unión a moléculas como los iones metálicos, el ATP y/o nucleótidos y núcleo, como componente celular enriquecido, que es congruente y esperable sabiendo que se trata de factores o cofactores de transcripción. Teniendo esto en cuenta, podemos decir que la regulación de genes enriquecidos en determinadas funciones biológicas podría estar condicionada no solo por CHD6, sino además por los factores/cofactores de transcripción que se regulan como resultado del silenciamiento de CHD6.

Dos genes *up*-regulados en condiciones de silenciamiento de CHD6, el MDM2 (un oncogén) y RCHY1 codifican ambos cofactores de transcripción de tipo E3-ubiquitin-ligasa que se encuentran asociados con las vías de señalización de p53 y además en el caso de MDM2 aquellas involucradas en el desarrollo de cáncer. Dado que ambas vías a su vez requieren o dan como resultado la regulación de distintos procesos biológicos como el ciclo/proliferación celular, la apoptosis y el envejecimiento; estas anotaciones estarían estrechamente vinculadas. Puesto que MDM2 es el principal regulador que media la degradación de p53, es posible que el enriquecimiento tanto de las vías de p53, cáncer, ciclo/proliferación celular y apoptosis sean debidas a un aumento en la expresión tanto de MDM2 como de RCHY1.

Existen otros 3 genes *up*-regulados en células silenciadas que codifican factores de transcripción: VDR (*vitamin D[1,25-dihydroxyvitamin D3] receptor*), SREBF1 (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) y DDIT3 (*DNA-damage inducible transcript variant 3*) y que se encuentran asociados al proceso de envejecimiento. Por tanto, es de esperar que procesos como la apoptosis o regulación negativa de la proliferación celular también puedan estar mediados por estos tres factores de transcripción. Además de los procesos anteriores, SREBF1 y DDIT3 podrían estar mediando la expresión diferencial de genes asociados a otros procesos como los del metabolismo de lípidos y los de respuesta a drogas

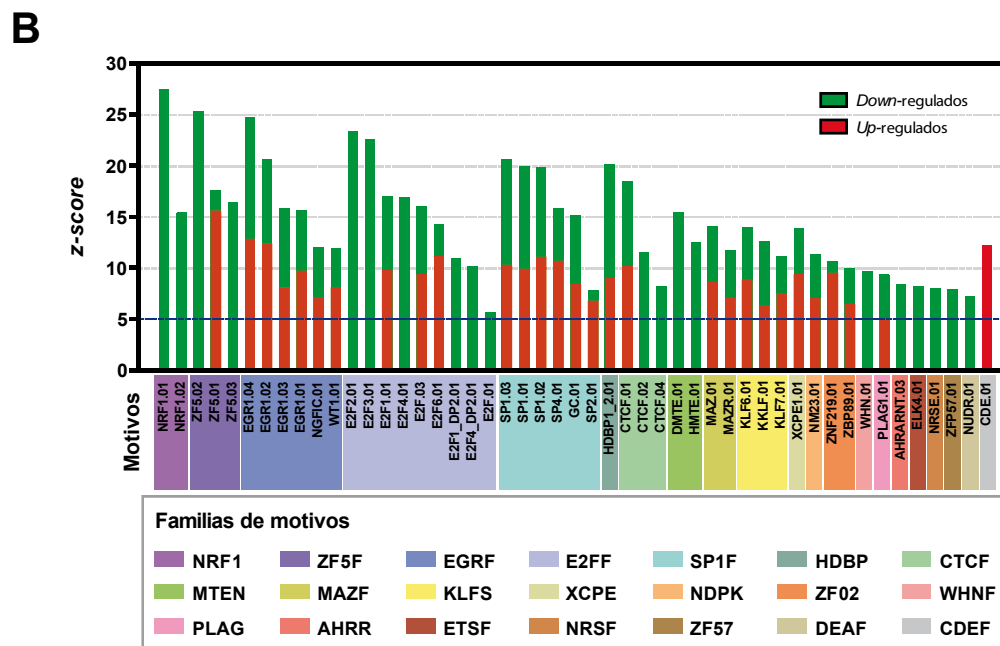
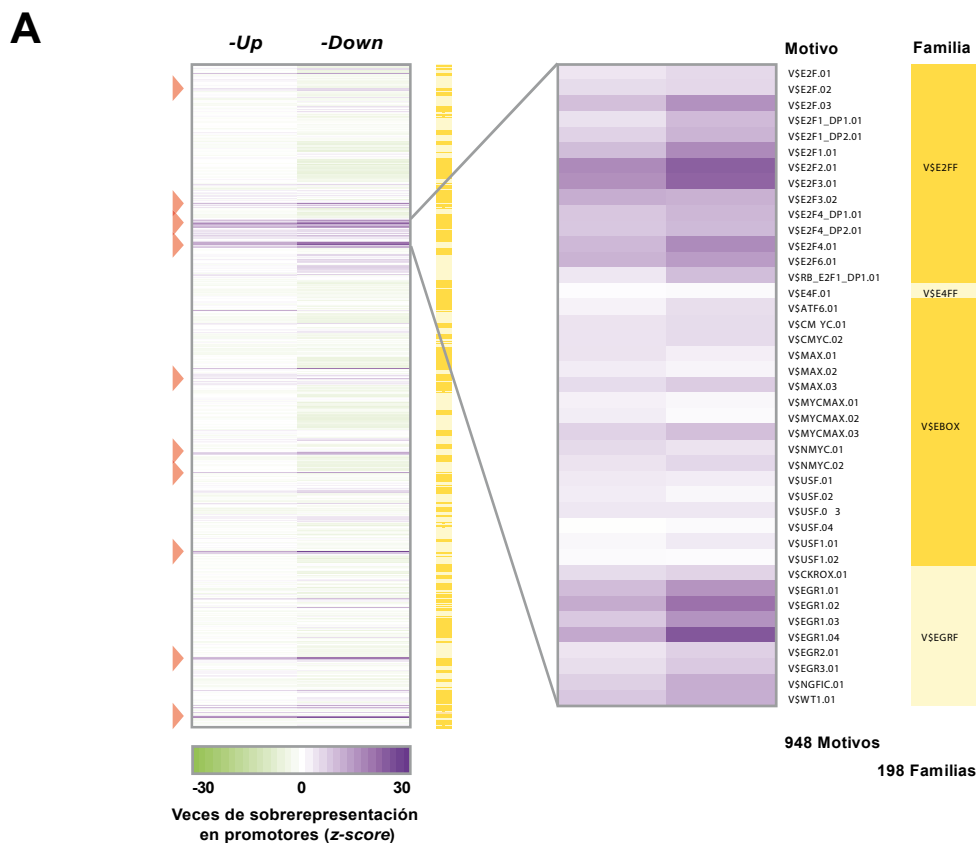
Dentro de los factores y/o cofactores de transcripción que se encuentran *down*-regulados, seis de ellos podrían estar involucrados en la modificación de cromatina como proceso biológico enriquecido, dado que: 1) son parte de la maquinaria remodeladora de cromatina dependiente de ATP, tal es el caso de CHD6, ARID2 y SUDS3; 2) son las

proteínas encargadas de realizar o reconocer las modificaciones químicas de las histonas como es el caso de HDAC4 y CHD6 respectivamente y 3) son componentes (SUZ12 y AEBP2) de un complejo mayor como *Polycomb Repression Complex 2* (PRC2) el cual regula la estabilidad y el mantenimiento de la heterocromatina.

La función molecular común tanto en genes *up*- como *down*-regulados que constituyen factores o cofactores de transcripción es la unión a proteínas, lo que es de esperar, dada la naturaleza de los mismos.

**Tabla 2. Factores de transcripción regulados por CHD6**

TF	REG.	ASOCIADO A LA FAMILIA DE MOTIVOS/ FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN/ CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN DEL GEN	ANOTACIONES ENRIQUECIDAS
MDM2	<i>Up</i> -	Transcription cofactor, ubiquitin ligase	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	(BP) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, (MF) Protein binding, (MF) Metal ion binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus, (CC) Cytosol, (CC) Plasma membrane, (KEGG) Pathways in cancer, (KEGG) p53 signaling pathway
VDR	<i>Up</i> -	RXR	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	(BP) Signal transduction, (BP) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, (BP) Negative regulation of cell proliferation, (BP) Aging, (MF) Protein binding, (MF) Metal ion binding, (CC) Nucleus, (CC) Cytosol
RCHY1	<i>Up</i> -	Transcription cofactor, ubiquitin ligase	Ring finger and CHY zinc finger domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	(MF) Protein binding, (MF) Metal ion binding, (MF) Protein homodimerization activity, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus, (KEGG) p53 signaling pathway
SREBF1	<i>Up</i> -	SREB	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	(BP) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, (BP) Lipid metabolic process, (BP) Response to drug, (BP) Aging, (MF) Protein binding, (CC) Nucleus
DDIT3	<i>Up</i> -	CHOP	DNA-damage-inducible transcript 3	(BP) Positive regulation of apoptotic process, (BP) Response to drug, (BP) Aging, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus
ID1	<i>Up</i> -	Transcription cofactor	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	(BP) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, (BP) Collagen metabolic process, (MF) Protein binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus
ID2	<i>Up</i> -	Transcription cofactor	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	(BP) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, (MF) Protein binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus, (CC) Cytosol
RELB	<i>Up</i> -	NFKB	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	(MF) Protein binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus, (CC) Cytosol
ZNF555	<i>Up</i> -		Zinc finger protein 555	(MF) Metal ion binding, (CC) Nucleus
IRX4	<i>Up</i> -	IRXF	Iroquois homeobox 4	(CC) Nucleus
TCEAL7	<i>Up</i> -	Transcription elongation factor	Transcription elongation factor A (SII)-like 7	(CC) Nucleus
FBXO11	<i>Up</i> -	Transcription cofactor, ubiquitin ligase Nedd8	F-box protein 11	
RORA	<i>Up</i> -	RORA	RAR-related orphan receptor A	
APPBP2	<i>Down</i> -	Transcription cofactor	Amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	(MF) Protein binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus, (CC) Membrane
HDAC4	<i>Down</i> -	Transcription cofactor, histone modification	Histone deacetylase 4	(BP) Chromatin modification, (MF) Protein binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus
RUNX3	<i>Down</i> -	HAML	Runt-related transcription factor 3	(MF) Protein binding, (MF) ATP binding, (CC) Cytoplasm, (CC) Nucleus
ARID2	<i>Down</i> -	Transcription cofactor, ATP-dependent chromatin remodelling	AT-rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	(BP) Chromatin modification, (MF) Protein binding, (CC) Nucleus
CHD6	<i>Down</i> -	Transcription cofactor, ATP-dependent chromatin remodelling	Chromodomain helicase DNA binding protein 6	(MF) Nucleotide binding, (MF) ATP binding, (CC) Nucleus
ELK3	<i>Down</i> -	ETSF	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	(MF) Protein binding, (CC) Nucleus, (CC) Mitochondrion
SUZ12	<i>Down</i> -	Transcription cofactor	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	(BP) Chromatin modification, (MF) Protein binding, (CC) Nucleus
AEBP2	<i>Down</i> -	Transcription cofactor	AE binding protein 2	(BP) Chromatin modification, (CC) Nucleus
POU2F1	<i>Down</i> -	OCT1	POU class 2 homeobox 1	(MF) Protein binding, (CC) Nucleus
SUDS3	<i>Down</i> -	Transcription cofactor	Suppressor of defective silencing 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	(BP) Chromatin modification, (MF) Protein binding
HOXA13	<i>Down</i> -	ABDB, HOXH	homeobox A13	(CC) Nucleus
LHX4	<i>Down</i> -	LHXF	LIM homeobox 4	(CC) Nucleus
NFE2L1	<i>Down</i> -	AP1R, TCFF	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	(CC) Nucleus



**Figura R4. Motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en los promotores de genes regulados por CHD6.**

(A) *Heatmap* que muestra el análisis de sobrerepresentación de 948 motivos canónicos de factores de transcripción, en las secuencias promotoras tanto de genes *down*- como *up*-regulados (152 y 139 genes respectivamente), los triángulos rojos señalan los motivos con valores de z-score más altos, mientras que las distintas barras amarillas delimitan las familias en las que se agrupan los distintos motivos, de acuerdo al programa *Genomatix*. (B) Selección de motivos enriquecidos con un z-score > 5 veces y que además son comunes en al menos el 65% de los genes regulados por CHD6.



### I.5 Enriquecimiento de motivos comunes de unión a factores de transcripción se encuentran sobrerrepresentados en genes regulados por CHD6

Para abordar este objetivo analizamos la región promotora putativa (-1000 pb +200 pb relativa al sitio de inicio de la transcripción (TSS)) de los genes regulados por CHD6. Para ello se utilizó el algoritmo “*MatInspector*” de la plataforma de *Genomatix Software Suite* (<https://www.genomatix.de>), que usa la base de datos de TRANSFAC de matrices de peso de sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) con los siguientes criterios: longitud de *core* igual a 4, similitud de *core*  $\geq 0.75$ , similitud de matriz optimizada y un p-valor  $<1 \times 10^{-5}$  (ver detalles en Materiales y Métodos), el resultado de este análisis se presenta en la **figura R4**.

De acuerdo a la versión usada para este análisis (Library genomatix 9.1 ver. nov 2013 que comprende un total de 948 matrices individuales de motivos de unión a factores de transcripción, agrupados en 198 familias), 49 matrices o motivos individuales (5,2%) agrupados en 21 familias (10,6%), se encuentran sobrerrepresentados con un z-score  $\geq 5$  y son comunes en más del 65% de los genes regulados por CHD6. En la **figura R4-A** vemos que los genes *down*-regulados poseen 48 motivos sobrerrepresentados, mientras que los genes *up*-regulados poseen 29, de los cuales todos excepto uno (CDE.01) son comunes a los *down*-regulados. Los motivos con mayor sobrerrepresentación en genes *up*-/*down*-regulados pertenecen a las familias NRF1, ZF5F, EGRF, SP1F y HDBP.

- El factor de transcripción NRF1 se ha descrito como una proteína sensible a oxidación que homodimeriza y activa la expresión de genes metabólicos clave que regulan el crecimiento celular, genes nucleares necesarios para la respuesta celular al frío (generación de precursores metabólicos y energía) y también como una proteína asociada a la regulación de la formación de neuritas.

- El factor de transcripción ZF5 también llamado ZBTB14 actúa como represor transcripcional, uniéndose a las repeticiones del trinucleotido (5'-d(GCC)(n)-3') de la región promotora del gen FMR1, cuya mutación conocida como “expansión de repeticiones de trinucleotidos GCC”, provoca el síndrome de X frágil (SXF) como consecuencia de la metilación del gen y la subsecuente falta de la proteína FMRP. También se ha descrito la unión de ZF5 a los promotores de los genes TK1, TK2 y MYC. Se ha visto generalmente presente en cáncer de seno ER positivo y asociado a un mayor grado tumoral.

- El motivo de unión al factor de transcripción HDBP1 también llamado SLC2A4RG, se encontró sobrerrepresentado tanto en los genes *up*- como *down*-regulados (aunque con 2 veces más de sobrerrepresentación en los *down*-regulados) dicho factor posee un dominio *c-clamp* capaz de unirse al promotor del gen HD (Huntington's disease gene) y GLUT4 y participar en la activación de dichos genes. Se ha descrito que interacciona con otro factor MEF2 para formar un complejo transactivador.

- La mayor cantidad de motivos sobrerrepresentados principalmente en genes *down*-regulados, pertenecen a la familia de factores transcripcionales E2FF, esta comprende tanto a los factores de transcripción E2F (E2F1-8), como miembros de la familia TFDP (TFDP1-4). Se ha descrito que los miembros de la familia TFDP forman un heterodímero con E2F, de forma que cooperan en la unión al DNA. Dichos factores son responsables de activar los genes necesarios para entrar en la fase S del ciclo celular, no obstante el complejo E2F1/TFDP parece mediar tanto la proliferación celular como la apoptosis.

- Uno de los motivos más sobrerrepresentados en el caso de los genes *up*-regulados pertenece a la familia CDEF, que comprende a un solo miembro, el factor de transcripción CDF-1 que regula la represión transcripcional dependiente del ciclo celular por medio de la unión a ciertos elementos de la región promotora, llamados *cell cycle-dependent element* (CDE) y *cell cycle genes homology region* (CHR) de los genes CDC25C, CDC2 y ciclina A, los cuales son reprimidos durante la fase G0/G1 del ciclo celular. Se ha descrito que la represión transcripcional de genes controlados por el módulo CDE-CHR es distinta a aquella mediada por miembros de la familia E2F.

- La familia de factores transcripcionales EGRF está conformada por los 4 miembros de la familia EGR (EGR1-4), la proteína CKROX también llamada ZBTB7B y la proteína 1 tumoral de Wilms WT1. De forma general, se trata de genes que son rápidamente inducidos aunque de forma transitoria por una amplia variedad de estímulos extracelulares que incluyen señales de activación, crecimiento y diferenciación celular, respuesta a daño tisular, apoptosis y respuesta a enfermedades crónicas del sistema nervioso. En el caso de los genes *down*-regulados por el silenciamiento de CHD6, vemos que se encuentran sobrerrepresentados los motivos correspondientes a los factores EGR1, EGR2 y CKROX. Mientras que en genes *up*-regulados sólo un motivo que corresponde a EGR1 se encuentra sobrerrepresentado.

### I.6 Búsqueda sesgada de anotaciones biológicas en familias de factores de transcripción con motivos enriquecidos en genes regulados por CHD6

Para dilucidar la relación biológica entre los motivos de unión a factores de transcripción sobrerrepresentados y las anotaciones biológicas enriquecidas en genes regulados por CHD6, se buscaron todas las anotaciones de *Gene Ontology* para cada familia de factores de transcripción que tienen motivos sobrerrepresentados en los genes regulados por CHD6 (**Tabla 3**). En dicha tabla se enfatizan aquellas familias que poseen G.O's. que tienen que ver con transducción de señales, regulación del ciclo o proliferación celular y apoptosis; ya que son las anotaciones con mayor número de genes regulados.

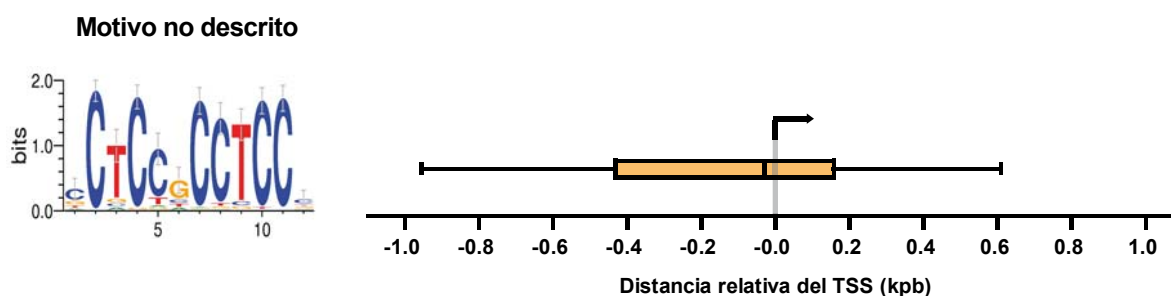
En la figura **suplementaria RS2**, se detalla la lista con los motivos canónicos de unión a factores de transcripción sobrerrepresentados en genes regulados por CHD6, en la cual muestra la secuencia consenso o logo de la matriz de peso, formada a partir del alineamiento múltiple de las secuencias promotoras de los genes regulados.

En la figura **suplementaria RS3**, se muestra un diagrama de tukey de los 10 motivos principales (z-score más alto) para cada grupo de genes regulados por CHD6, con el que se representa la distribución relativa al TSS del número de ocurrencias o veces de aparición del motivo en el promotor putativo. Como se observa, en la mayoría de los motivos, el 50% de las ocurrencias se encuentran en  $\pm 200$  pb del TSS, lo cual es esperable dado que la mayor parte de los factores de transcripción tienen sus sitios de unión dentro de este límite. Vemos que además la distribución es asimétrica, y en algunos casos, las ocurrencias se encuentran sesgadas hacia la parte *upstream* o *downstream*; esto podría deberse a que el análisis de búsqueda de motivos se hizo en ambos sentidos de la secuencia promotora, por lo que una sobrerrepresentación de genes que se expresan en un sentido u otro podría ser la explicación al incremento de esta frecuencia.

Además de la búsqueda de motivos canónicos para factores de transcripción, se hizo una búsqueda de motivos no anotados que fueran comunes por lo menos al 70% de las secuencias reguladas por CHD6, con el objetivo de predecir motivos de unión a CHD6. Los criterios usados para este análisis fueron los siguientes: longitud de core igual 10 nucleótidos, similitud de core  $\geq 0.75$  y una similitud de matriz  $> 0.8$ . El resultado de este análisis se muestra en la **figura R5**, el cual exhibe un motivo de 12 nucleótidos que se encuentra mayormente distribuido en la región comprendida entre -400 y +200pb del TSS de las regiones promotoras putativas de los genes *down*-regulados para CHD6. En el caso de las secuencias promotoras de genes *up*-regulados no se encontró motivo alguno siguiendo los criterios arriba descritos.

**Tabla 3. Familias de factores de transcripción con motivos enriquecidos en genes regulados por CHD6**

REG.	FAMILIA	DESCRIPCIÓN	DOMINIO/S DE UNIÓN	GOs RELACIONADOS CON TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES/ CICLO Y/O PROLIFERACIÓN CELULAR/ APOPTOSIS	% *
Down-	NRF1	Nuclear respiratory factor 1	bZIP	-	-
Up-/down-	ZF5F	ZF5 POZ domain zinc finger	BTB-POZ C2H2 zinc fingers	-	-
Down-	HDBP	Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	CR3	no information available	-
Down-	MTEN	Core promoter motif ten elements	n.i.a.	no information available	-
Down-	TF2B	RNA polymerase II transcription factor II B	n.i.a.	-	-
Up-/down-	E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	E2F winged helix	G1 phase of mitotic cell cycle, G1/S transition of mitotic cell cycle, intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator, lens fiber cell apoptotic process, negative regulation of cell proliferation, positive regulation of cell proliferation, regulation of cell cycle, regulation of cell proliferation	8/16 (50.0%)
Up-	CDEF	Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	binding factor not characterized	no information available	-
Down-	KLFS	Krueppel like transcription factors	C2H2 zinc finger domain	negative regulation of cell proliferation, negative regulation of smooth muscle cell proliferation, regulation of cell proliferation	3/25 (12.0%)
Up-/down-	EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C and related factors	C2H2 zinc finger domain	apoptotic DNA fragmentation, negative regulation of apoptotic process, negative regulation of cell proliferation, positive regulation of cell proliferation	4/41 (9.8%)
Down-	MAZF	Myc associated zinc fingers	C2H2 zinc finger domain	-	-
Down-	CTCF	CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	C2H2 zinc finger domain	-	-
Down-	AHRR	AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors	bHLH-PAS	apoptotic process, cell cycle, positive regulation of endothelial cell proliferation, regulation of B cell proliferation	4/34 (11.8%)
Up-	ZF07	C2H2 zinc finger transcription factors 7	C2H2 zinc finger domain	no information available	-
Down-	NRSF	Neuron-restrictive silencer factor	C2H2 zinc finger domain	-	-
Down-	ZF57	KRAB domain zinc finger protein 57	KRAB C2H2 zinc fingers	-	-
Down-	ETSF	Human and murine ETS1 factors	ETS domain	apoptotic nuclear changes, cell cycle, cell proliferation, execution phase of apoptosis, natural killer cell proliferation, negative regulation of cell cycle, negative regulation of cell proliferation, NK T cell proliferation, signal transduction	9/51 (17.6%)
Down-	DEAF	Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from <i>D. melanogaster</i>	SAND domain	regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	1/4 (25%)
Down-	MYBL	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	MYB domain	-	-
Down-	SP1F	GC-Box factors SP1/GC	C2H2 zinc finger domain	cell proliferation, negative regulation of cell proliferation, positive regulation of cell proliferation	3/40 (7.5%)
Down-	XCPE	Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	no information available	no information available	-



**Figura R5. Predicción de un nuevo motivo presente en los promotores de *down*-regulados.**

(izq.) Secuencia consenso presente en al menos el 70% de genes *down*-regulados (de un total de 139). La identificación de este nuevo motivo se hizo mediante el programa Genomatix. (der.) Diagrama tipo *box-and-whisker* que indica la localización relativa al *transcription start site* (TSS) de las secuencias promotoras que contienen el nuevo motivo, esto significa que por lo menos el 50% de los motivos encontrados están comprendidos en la región -400 y +200 pb del TSS.

## II. VALIDACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA Y FUNCIÓN DE CHD6 EN EL CICLO CELULAR

### II.1 Validación del transcriptoma de células silenciadas para CHD6 y regulación de los niveles de expresión de los genes GDF15, NEDD4 y HPRT1

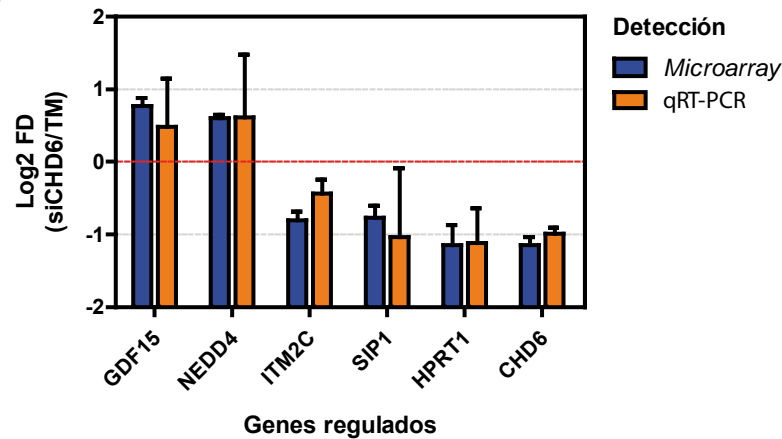
Con objeto de validar los datos obtenidos del transcriptoma, se hizo una selección restrictiva de genes tanto *up*- como *down*- regulados por CHD6, que tuvieran un FD mayor o menor a 1,5 veces y un  $p$ -valor < 0.05 (**Figura R6-A**). De este subconjunto se seleccionaron arbitrariamente genes *up*- y *down*- regulados por CHD6 como GDF15, NEDD4, HPRT1, ITM2C y SIP1, cuya expresión en células control y silenciadas para CHD6, se cuantificó por PCR a tiempo real (qPCR) y se comparó con los valores obtenidos en el transcriptoma (**Figura R6-B**). En todos los casos se observan diferencias en la expresión de estos genes similares a los obtenidos en el transcriptoma al comparar células silenciadas respecto al control TM.

Los resultados arriba descritos, han sido obtenidos utilizando un silenciador con diana en el exón 30, no obstante dado que CHD6 es una proteína muy grande codificada por 37 exones, hace posible la existencia de distintas formas de procesamiento del mensajero de CHD6. Por ello, es importante saber si el efecto en la expresión diferencial de los genes validados por qPCR se obtiene también con otros silenciadores con una diana distinta al exón 30. Debido a esto utilizamos una batería de cuatro silenciadores dirigidos al exón 3, 9, 34 y 37 del mensajero de CHD6 (**Figura R7-A**) y que disminuyen la cantidad de la proteína CHD6 por *Western-Blot* (**Figura R7-B**).

A

N	ID SONTA	GEN	DESCRIPCIÓN	P-V.	FD
<b>Up-regulados</b>					
1	XR_426754		PREDICTED: neurogenic locus notch homolog protein 2-like misc_RNA . LOC101929796	1.9e -4	2.27
1	NM_004864	GDF15	Growth differentiation factor 15	1.3e -3	1.71
1	NM_019593	GPCPD1	Glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae)	2.6e -4	1.65
3	NM_001554	CYR61	Cysteine -rich angiogenic inducer 61	3.0e -3	1.55
1	NM_020734	RIMKLB	Ribosomal modification protein rimK -like family member B	5.8e -4	1.54
1	NM_182760	SUMF1	Sulfatase modifying factor 1 transcript variant 1	5.0e -4	1.53
2	NM_198400	NEDD 4	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 E3 ubiquitin protein ligase transcript variant 2	8.9e -4	1.51
3	NM_001554	CYR61	Cysteine -rich angiogenic inducer 61	1.2e -3	1.50
<b>Down-regulados</b>					
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	7.0e -3	-2.28
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	5.5e -3	-2.25
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	6.5e -3	-2.23
2	NM_032221	CHD6	Chromodomain helicase DNA binding protein 6	2.5e -4	-2.22
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	7.0e -3	-2.20
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	6.5e -3	-2.19
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	4.3e -3	-2.17
10	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	8.0e -3	-2.16
1	NM_002155	HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6	7.5e -3	-1.76
2	NM_030926	ITM2C	Integral membrane protein 2C transcript variant 1	1.4e -3	-1.74
1	NM_003616	SIP1	Survival of motor neuron protein interacting protein 1	5.9e -3	-1.71
1	NM_018060	IARS2	Isoleucyl -tRNA synthetase 2 mitochondrial	2.8e -3	-1.66
4	NM_032932	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4	9.5e -4	-1.63
1	NM_130810	DYX1C1	Dyslexia susceptibility 1 candidate 1 transcript variant 1	3.6e -3	-1.60
1	NM_152391	PQLC3	PQ loop repeat containing 3 transcript variant 1	1.9e -3	-1.55
2	NM_012333	MYCBP	MYC binding protein transcript variant 1	4.9e -4	-1.54
1	ENST00000228741	ELK3	ELK3 ETS -domain protein (SRF accessory protein 2)	2.0e -3	-1.51
1	NM_002572	PAFAH1B2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 2 transcript variant 1	4.2e -3	-1.50

B



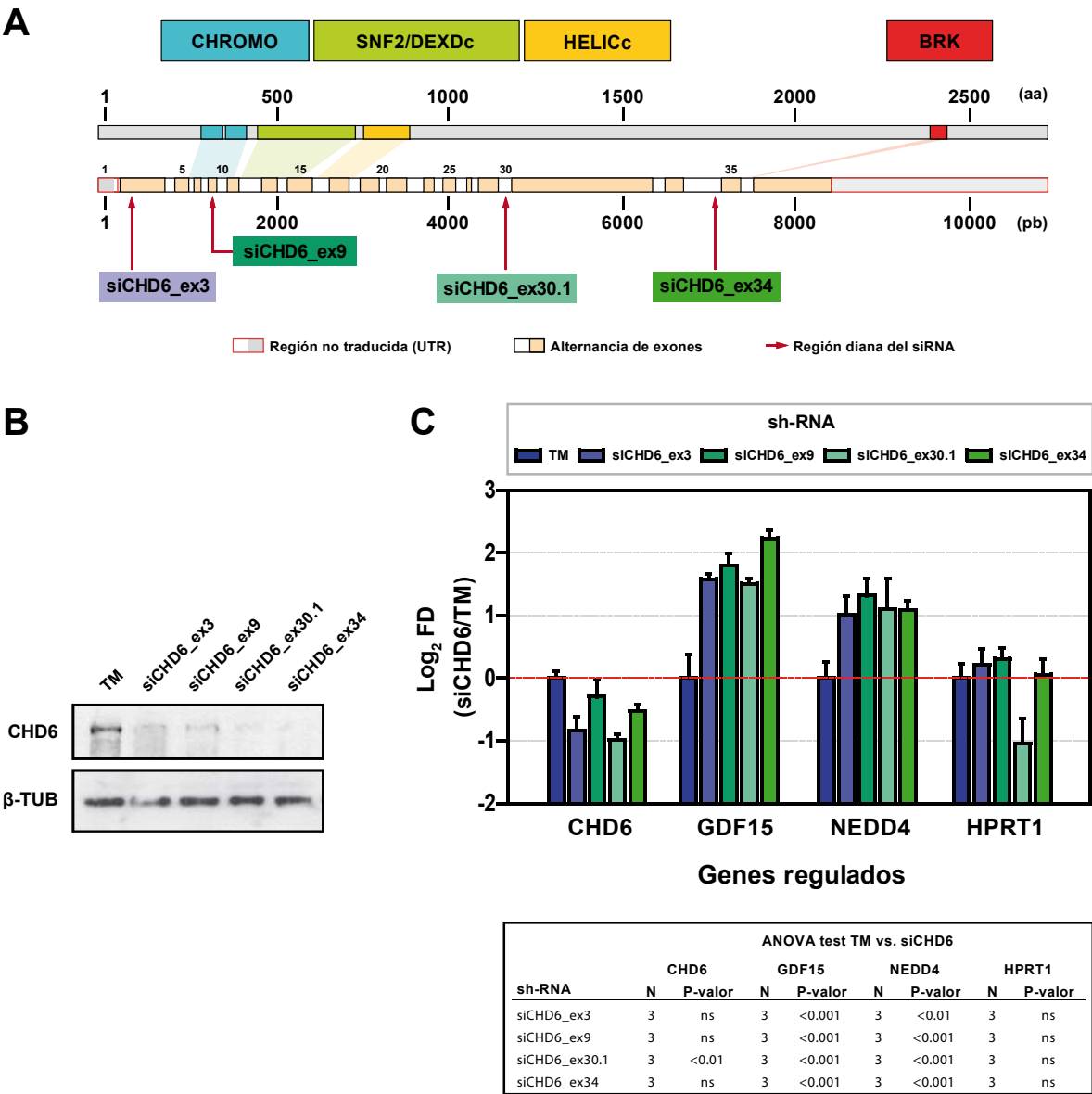
**Figura R6. Validación por PCR a tiempo real de genes diferencialmente expresados en células silenciadas para CHD6.**

(A) Selección de genes candidatos para validación por PCR a tiempo real (qPCR). Para la obtención de esta lista se usaron los criterios estadísticos ( $p < 0.005$  y  $FD > 1.5$  o  $< -1.5$ ). (B) Análisis comparativo entre los valores de expresión relativa obtenidos por *microarray* y los obtenidos en genes candidatos de validación por qPCR. Para ello se transfectaron células con los silenciadores siCHD6\_ex30.1 y TM y 48h post-transfección se aisló el RNA para realizar la qPCR según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Valores obtenidos de tres experimentos independientes y normalizados por  $\beta$ -actina.

A partir de células transfectadas con los distintos silenciadores para CHD6, se cuantificó la expresión diferencial por qPCR de los genes GDF15, NEDD4 y HPRT1. Como se observa en la **figura R7-C**, para los genes GDF15 y NEDD4 el efecto *up*-regulatorio por el silenciamiento de CHD6 es similar y significativo con los distintos silenciadores. En el caso del gen HPRT1 solamente las células transfectadas con el silenciador del exón 30, tienen una disminución significativa en la expresión respecto a TM, esto sugiere que la regulación de HPRT1 es distinta a la de GDF15 y NEDD4 por CHD6.

## ***II.2 Modulación de la expresión de HPRT1 en células expresando distintos silenciadores de CHD6***

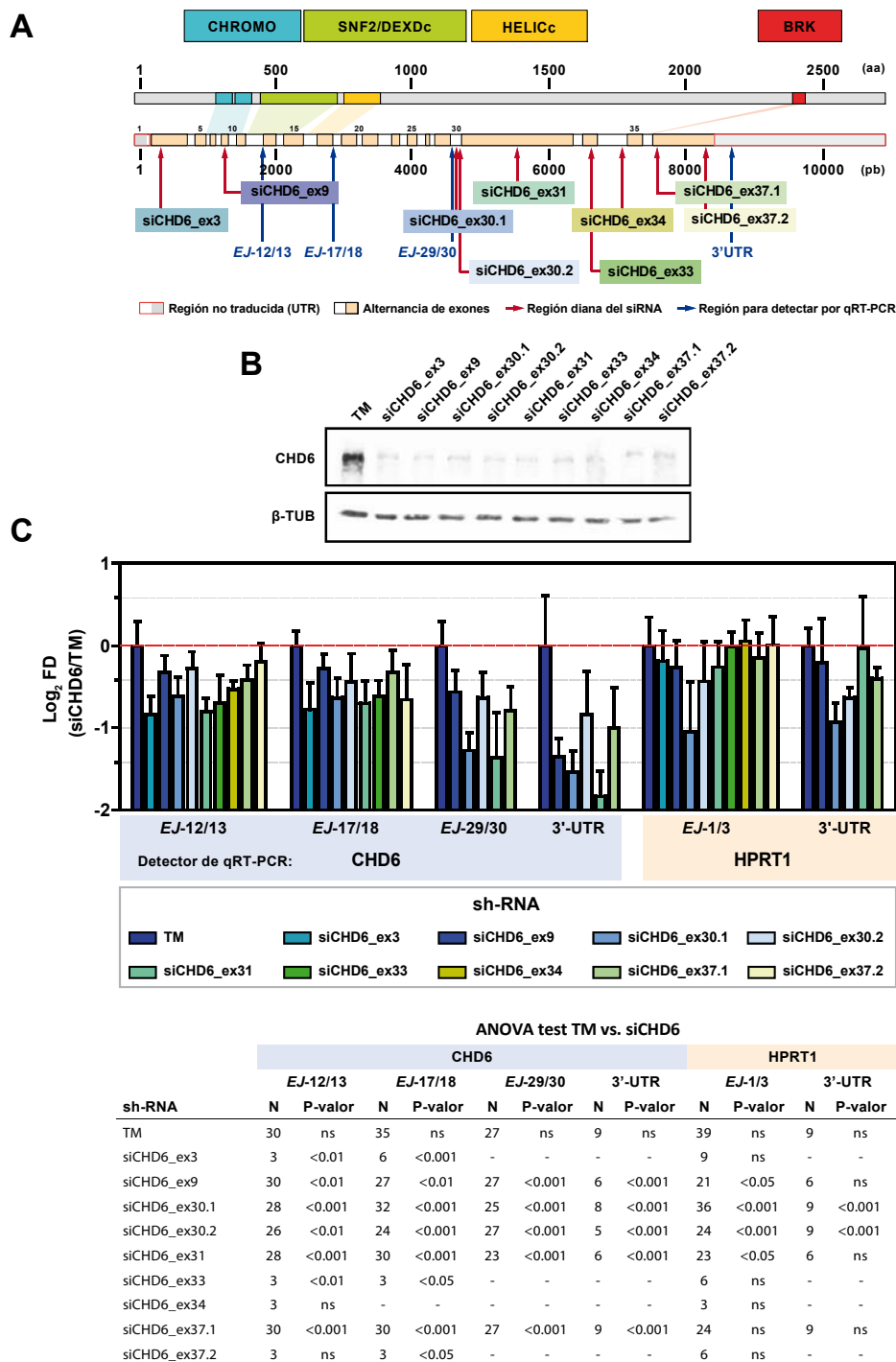
HPRT1 tiene un papel central en el metabolismo de purinas y es el agente causal del síndrome de Lesh-Nyhan,(Jiralerspong and Patel, 1996) por ello decidimos explorar más exhaustivamente su posible regulación por CHD6. Puesto que CHD6 es una proteína de gran tamaño que contiene 39 exones, construimos plásmidos expresando silenciadores adicionales dirigidos contra distintos exones por si formas de procesamiento alternativo de CHD6 pudieran ser las involucradas en la regulación de HPRT1. Uno de los nuevos silenciadores se dirigió contra una región diferente del exón 30 (siCHD6\_ex30.2) para descartar posibles efectos colaterales del silenciador utilizado previamente (siCHD6\_ex30.1) y otros se dirigieron contra los exones 31, 34 y 37 (siCHD6\_ex31, siCHD6\_ex34 and siCHD6\_ex37). Se utilizaron un total de 8 plásmidos expresando distintos silenciadores de CHD6 además del silenciador control TM, para transfectar células HEK293T y realizar qPCR detectando diferentes regiones *exon-junction* o el extremo 3' no traducido de CHD6 y de HPRT1 (**Figura R8-A**). Todos los silenciadores de CHD6 redujeron la expresión del mRNA de CHD6 conteniendo los *exon-junctions* 12/13, 17/18, 29/30 o la zona 3' no traducida en distinta medida (**Figura R8-C**). Respecto a HPRT1, los silenciadores siCHD6\_ex30.1 y siCHD6\_ex30.2, redujeron significativamente la expresión del mRNA de HPRT1 conteniendo exon junctions 1-3 (la forma madura de HPRT en células humanas REF) y el 3' no traducido. Estos resultados indican que los exones 3, 33, 34 o 37 de CHD6 no están involucrados en la regulación de HPRT1, mientras que variantes de CHD6 conteniendo los exones 9, 30 y 31 modulan su expresión.



**Figura R7. Validación de genes regulados por CHD6 con distintos silenciadores.**

(A) Esquema ilustrativo que muestra las regiones del mRNA que son diana para los silenciadores adicionales generados para CHD6 y que se indican en los recuadros con distintos colores (B) Comprobación del silenciamiento de CHD6 mediante *Western-Blot* de lisados de células HEK293T, 48h post-transfección con los distintos silenciadores para CHD6. (C) (Panel superior) Cuantificación de la expresión diferencial o *Fold change* (FD) de tres genes candidatos de regulación por CHD6 mediante RT-qPCR, a partir del RNA total obtenido de células HEK293T 48h post-transfección con los distintos silenciadores. Los valores mostrados representan el cociente (silenciamiento de CHD6/TM) de valores normalizados con el gen  $\beta$ -Actina. (Panel inferior) Análisis estadístico realizado para contrastar las medias entre los valores normalizados del silenciamiento de CHD6 con los distintos silenciadores y el control TM.





**Figura R8. Posibles formas de *splicing* alternativo de CHD6 regulan la expresión del gen HPRT1.**

(A) Esquema ilustrativo que muestra las regiones del mRNA (flechas rojas) que son diana para los distintos silenciadores de CHD6, y que se indican en los recuadros con distintos colores. También se indican las regiones usadas para diseñar los oligos de detección para RT-qPCR (flechas azules); algunos de ellos se diseñaron para detectar las uniones entre exones o *exon-junction* (EJ-) (B) Comprobación del silenciamiento de CHD6 mediante *Western-Blot* de lisados de células HEK293T, 48h post-transfección con los distintos silenciadores para CHD6. (C) (Sup.) Cuantificación de la expresión diferencial o *Fold change* (FD) de CHD6 y HPRT1 mediante RT-qPCR, a partir del RNA total obtenido de células HEK293T 48h post-transfección con los distintos silenciadores. Los valores mostrados representan el cociente (silenciamiento de CHD6/TM) de valores normalizados con el gen  $\beta$ -Actina. (Inf.) Análisis estadístico realizado para contrastar las medias entre los valores normalizados tanto del silenciamiento de CHD6 como de HPRT1 y el control TM.

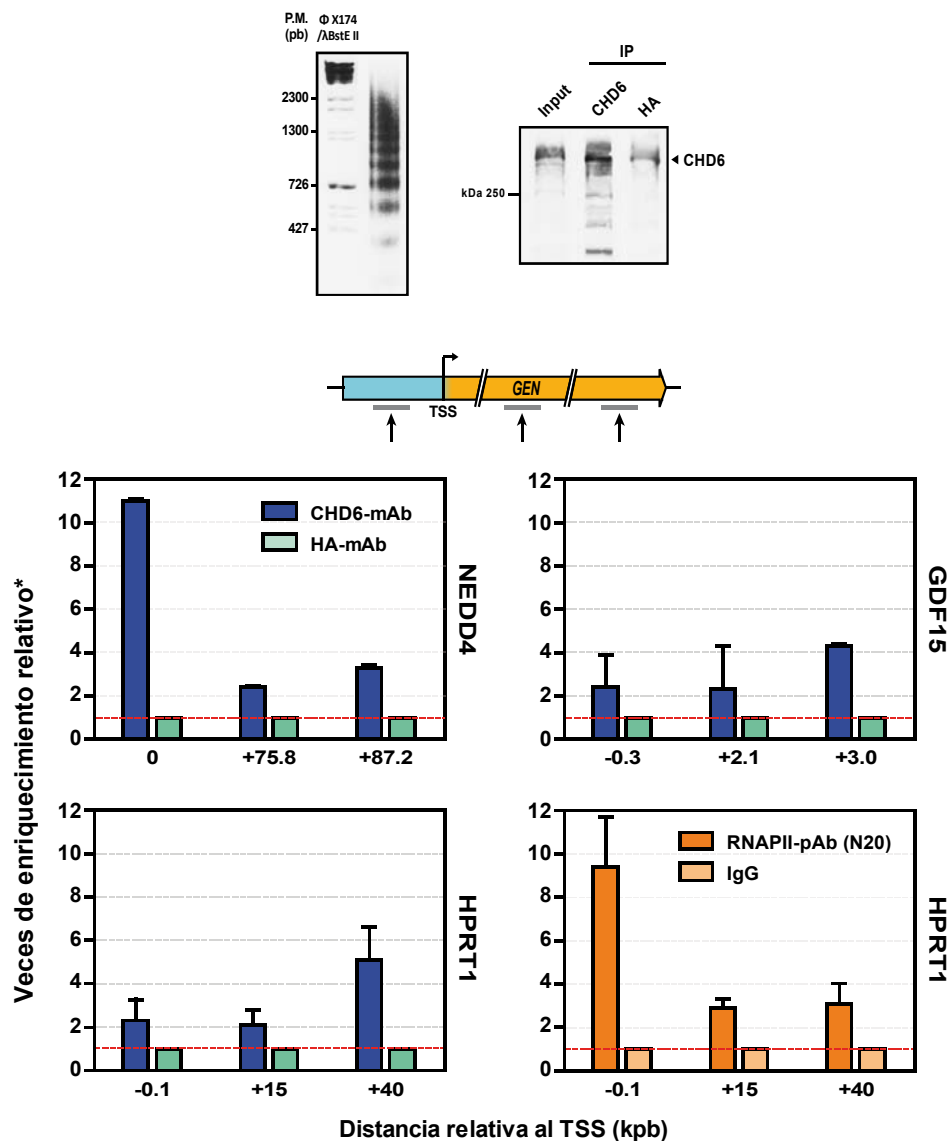
### ***II.3 CHD6 se une a regiones promotoras y codificantes de NEDD4, GDF15 y HPRT1***

Para caracterizar la posible interacción de CHD6 con los promotores putativos en los genes donde se ha validado por qPCR la regulación de su expresión diferencial, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sobre distintas regiones de los genes GDF15, NEDD4 y HPRT1 en células HEK293T usando un anticuerpo monoclonal anti-CHD6 y como control negativo un anticuerpo monoclonal anti-HA (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la **figura R9-A**, para realizar los experimentos de ChIP fue necesario fragmentar la cromatina, mediante el tratamiento conjunto de MNasa y sonicación obteniendo una resolución adecuada de fragmentos de DNA (200-1400pb). A partir de la cromatina fragmentada, se inmunoprecipitó CHD6, observándose que la cantidad de CHD6 inmunoprecipitada con el anticuerpo monoclonal es mayor a la obtenida con el anticuerpo control antiHA. La cantidad de DNA, de los fragmentos inmuprecipitados por CHD6 para las distintas regiones amplificadas de los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1 fue cuantificada por RT-qPCR. La especificidad del ChIP fue verificada por comparación de la señal obtenida con el anticuerpo antiCHD6 y aquella obtenida con el anticuerpo control antiHA (**Figura R9-B**).

- Como se observa para el caso del gen NEDD4, el DNA que codifica este gen se encuentra enriquecido significativamente más de 10 veces en el inmunoprecipitado de CHD6 respecto al control, en la región que comprende el TSS de su promotor putativo. No obstante también se observa que las regiones que comprenden el gen de NEDD4 entre las posiciones +75,8 y +87,2 respecto al TSS también se encuentran enriquecidas en el inmunoprecipitado de CHD6 (2-4 veces), aunque con menor magnitud respecto del TSS. Según las bases de datos de *ENCODE-UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) que recopila información de experimentos de ChIP, estas regiones constituyen: 1) para el caso de la región 0, una región a la que se unen fuertemente marcadores de cromatina transcripcionalmente activa o 2) para las regiones +75,8 y +87,2 de forma más heterogénea dependiente de la línea celular, constituyen una región a la que se unen marcadores asociados a elongación de la transcripción o bien regiones con una baja señal de unión a marcadores (heterocromatina).

- En el gen GDF15, no se observa un enriquecimiento significativo de las regiones comprendidas entre -0.3 y +2.1, y se encuentra un enriquecimiento significativo de 4 veces en la región +3,0 en el inmunoprecipitado de CHD6 con respecto al anticuerpo control. De acuerdo a la base de datos anteriormente descrita, estas regiones comprenden: 1) región -0.3 tanto potenciadores fuertes como débiles; 2) región +2.1, promotores muy activos, poco

activos e incluso reprimidos y 3) región +3,0, asociada a elongación y a represión transcripcional.



**Figura R9. CHD6 se une a regiones promotoras y codificantes de los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1.**

(A) (*Izq.*) Células HEK293T fueron fijadas con formaldehído y de ellas se extrajo la cromatina, la cual fue sonicada y digerida según lo descrito en Materiales y Métodos. El DNA obtenido fue purificado y analizado en un gel de agarosa al 1%. En la figura se muestran que la cromatina fue mayormente digerida en tamaños de entre 2 y 10 nucleosomas (~0.4-2.0kpb). (*Der.*) Inmunoprecipitación de CHD6. Se obtuvieron extractos nucleares de células HEK293T y se inmunoprecipitó CHD6 según lo descrito en Materiales y Métodos. Como control negativo se usó un anticuerpo anti-HA también monoclonal. (B) *ChIP* de CHD6. Se preparó cromatina de la forma descrita y se inmunoprecipitó con los anticuerpos anti-CHD6 y anti-HA antes mencionados. Adicionalmente se utilizó como control positivo un anticuerpo anti-RNAPII. Los complejos cromatina-anticuerpo fueron tratados con proteinasa K y se purificó el DNA mediante columnas de afinidad. El DNA obtenido se analizó mediante qPCR para diferentes regiones de los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1, tal y como se indica en el panel superior mediante barras grises. (\*) Las veces de enriquecimiento se refiere al cociente entre la señal obtenida para el anticuerpo anti-CHD6 (o también del anti-RNAPII) entre la señal obtenida para el anticuerpo control (anti-HA). Los valores mostrados representan la media de 3 experimentos independientes.

- En lo que respecta al gen HPRT1, se observan unos niveles de enriquecimiento muy bajos, pero significativos en las regiones -0.2 y +15 y un enriquecimiento significativo de 5 veces respecto al control en la región +40. La región -0.2 según la base de datos, se corresponde con una zona promotora fuertemente activa, mientras que las regiones +15 y +40 constituyen zonas de elongación o bien zonas con bajo nivel transcripcional.

Estos datos en conjunto indican que CHD6 se encuentra asociado directamente a los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1. Además se encuentra mayormente asociado a una región donde existen marcadores de cromatina activa (promotor activo) en el gen NEDD4, o bien a una región que se asocia a marcadores de elongación o con bajos niveles transcripcionales.

## II.4 Función de CHD6 en el ciclo celular

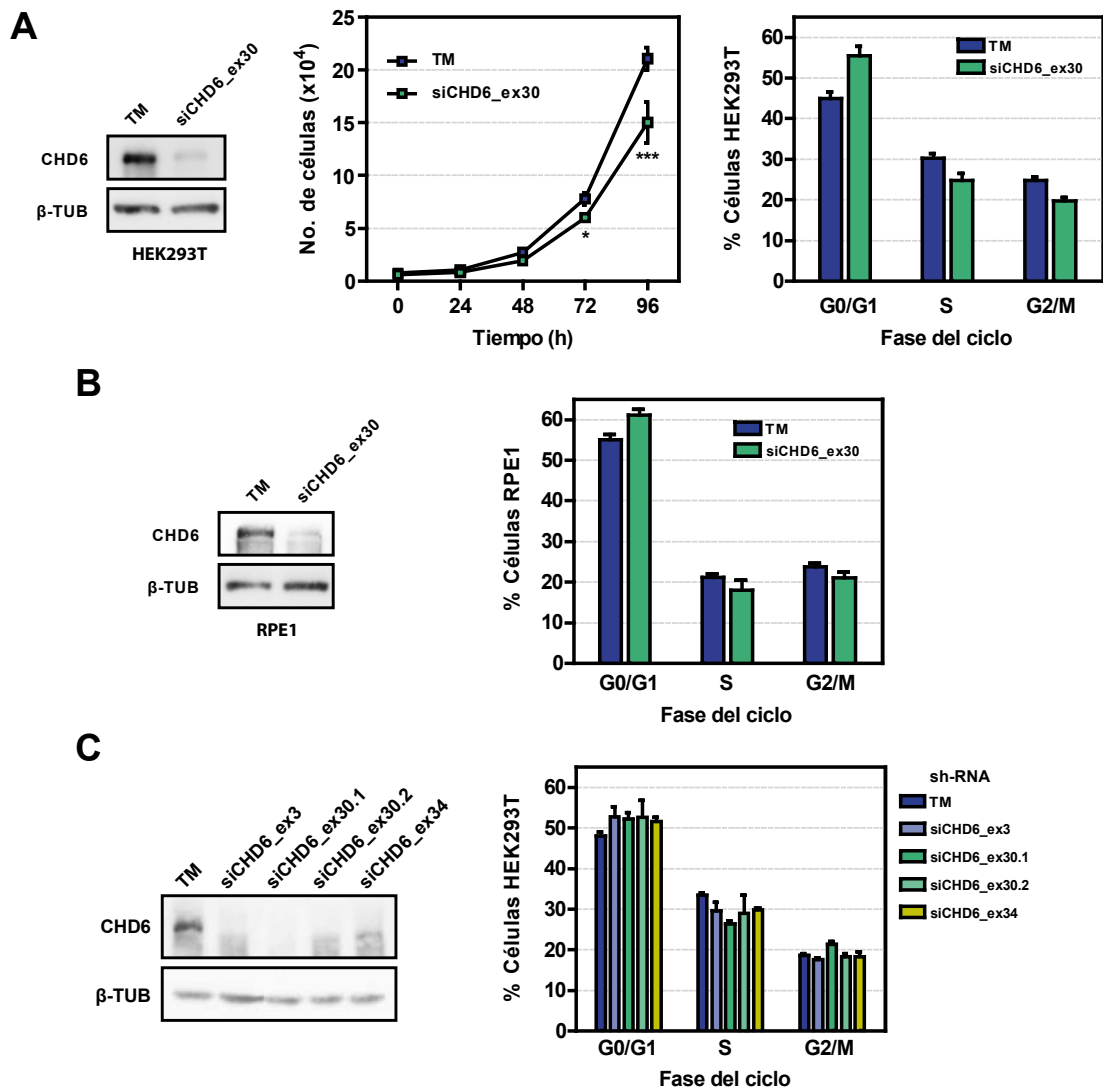
### II.4.1 CHD6 disminuye la proliferación celular y aumenta la cantidad de células quiescentes

Según lo descrito anteriormente, células silenciadas de CHD6 disminuyen la expresión de ciertos genes y enriquecen procesos biológicos tales como la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Además también se observó que más del 65% de las secuencias promotoras de los genes *down*-regulados presentan motivos comunes y sobrerrepresentados de factores de transcripción pertenecientes a familias que se relacionan con la regulación del ciclo celular y/o apoptosis, tales como E2FF y EGRF. Esto sugeriría que CHD6 podría cumplir un papel importante en la regulación de dichos procesos. Como primer abordaje para analizar esta posibilidad se realizó una cinética de crecimiento celular, para ello se sembraron en pocillos M6 la misma cantidad de células HEK293T establemente silenciadas para CHD6 y células control TM, y posteriormente se procedió al conteo celular por citometría siguiendo el protocolo estándar de tinción con yoduro de propidio (*IP*) (ver Materiales y Métodos).

En la **figura R10-A** (*izq*), se observa el nivel de silenciamiento estable para CHD6 mediante análisis de *Western-Blot*, por otro lado se observa una disminución significativa del número de células a 72 y 96h después de sembrar, en células silenciadas para CHD6 respecto a las células control TM. Una vez observado el efecto negativo sobre el crecimiento de células silenciadas establemente para CHD6, analizamos que fase del ciclo celular estaba siendo afectada para ello realizamos un análisis de ciclo celular, mediante FACS de células silenciadas para CHD6 transitoriamente, 48h post-transfección (evitando posibles efectos compensatorios del silenciamiento estable) y células control. En la figura R10-A (*der*), observamos que las células silenciadas para CHD6 se encuentran significativamente aumentadas en fase G0/G1 respecto de las células control TM. Para analizar si el efecto del silenciamiento de CHD6 ocurría también en otras líneas celulares, se realizó un silenciamiento de CHD6 en células del epitelio pigmentario retinal de origen

human RPE1. La expresión del silenciador siCHD6\_ex30.1 produjo una disminución muy acusada de CHD6 en estas células como se puede observar en la figura 12B y el análisis de las distintas fases del ciclo mostró , por consiguiente se observa también un disminución significativa de células en la fase de síntesis respecto de las células TM. Para analizar si el efecto del silenciamiento de CHD6 ocurría también en otras líneas celulares, se realizó un silenciamiento de CHD6 en células del epitelio pigmentario retinal de origen humano RPE1. La expresión del silenciador siCHD6\_ex30.1 produjo una disminución muy acusada de CHD6 en estas células como se puede observar en la figura 12B y el análisis de las distintas fases del ciclo mostró , por consiguiente se observa también un disminución significativa de células en la fase de síntesis respecto de las células TM. Para analizar si el efecto del silenciamiento de CHD6 ocurría también en otras líneas celulares, se realizó un silenciamiento de CHD6 en células del epitelio pigmentario retinal de origen humano (RPE1). La expresión del silenciador siCHD6\_ex30.1 produjo una disminución muy acusada de CHD6 en estas células como se puede observar en la **figura R10-B** y el análisis de las distintas fases del ciclo mostró también una disminución significativa de células en la fase de síntesis respecto de las células TM.

Como se ha mencionado previamente, CHD6 es una proteína con 37 exones que puede tener formas alternativas de *splicing*, por tanto podría existir una regulación distinta atendiendo a dicho fenómeno biológico. Puesto que sólo se utilizó el silenciador para el exón 30 de CHD6 en estos experimentos, nos planteamos conocer si el efecto diferencial en las fases del ciclo celular era exclusivo de este silenciador, o bien, si se obtienen resultados similares con otros silenciadores. En la **figura R10-C** se comprueba los niveles de silenciamiento obtenido para CHD6 a 48h post-transfección, con otro silenciador del exón 30 (siCHD6\_ex30.2) y dos silenciadores adicionales (siCHD6\_exon3 y siCHD6.34). Los resultados del FACS de las células transfectadas con los distintos silenciadores para CHD6, permiten observar un aumento de las células en la fase G0/G1 con los diferentes silenciadores y simultáneamente una disminución de células en la fase de síntesis. Podemos concluir que CHD6 es necesario para la transición de las células en fase G0/G1 a la fase de síntesis, en consecuencia la deficiencia de CHD6 aumenta la cantidad de células quiescentes y con ello una reducción de la proliferación celular.

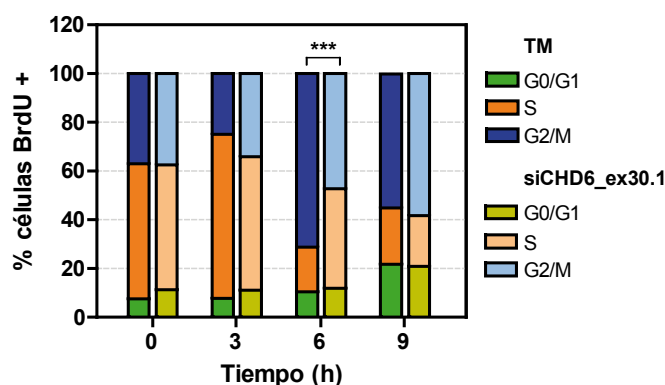


**Figura R10. El silenciamiento de CHD6 causa una disminución en la proliferación y una acumulación de células en la fase G0/G1.**

(A) (*Izq.*) Análisis de *Western-Blot* usando los anticuerpos anti-CHD6 y anti-β-TUB como control de carga, a partir de extractos de células establemente silenciadas para CHD6 (siCHD6\_ex30.1 y control TM) y seleccionadas con puomicina según se describe en Materiales y Métodos. (*Med.*) Cinética de crecimiento celular. Células HEK293T establemente silenciadas para CHD6 y control TM fueron sembradas y recogidas en los tiempos señalados para ser teñidas con yoduro de propidio y posteriormente cuantificadas mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo. (*Der.*) Análisis de ciclo celular. Células establemente silenciadas para CHD6, no sincronizadas y en crecimiento exponencial, fueron recolectadas a 72h post-siembra para su análisis mediante FACS. Los valores indican la media  $\pm$  SEM ( $n=4$ ) (B) Similar a (A) pero en células RPE1. (C) Similar a (A) pero con un silenciador adicional del exón 30 distinto (ex30.2) y dos más para los exones 3 y 34 de CHD6, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan la media  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

### II.4.1.1 CHD6 es necesario para la progresión de la fase S a la fase G2/M

Los resultados anteriores, demuestran que la deficiencia de CHD6 altera la proporción de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo, y con ello, la correcta progresión durante el mismo. Para confirmar dichas observaciones, realizamos un ensayo de pulso y caza de bromodeoxiuridina o BrdU, comparando células silenciadas 48 h post-transfección para CHD6 con células control TM. Este ensayo consiste en marcar el contenido de DNA de células que se encuentran en la fase de síntesis con un pulso de BrdU, y una vez marcadas este se elimina mediante lavados. A partir de este momento (T0) se cuantifica la pérdida de señal de BrdU de las células marcadas (BrdU+), como resultado de la división celular y por consiguiente de la correcta progresión del ciclo. En la **figura R11**, observamos que a 6 horas posteriores al pulso de BrdU, existe una diferencia significativa en la proporción de células BrdU(+) en la fase de síntesis respecto de las células control, lo que significa un enlentecimiento en la pérdida de DNA marcado debido a una disminución en la división celular. Estos resultados junto con la cinética de crecimiento demuestran que CHD6 es necesario para la correcta progresión del ciclo celular controlando la progresión de la síntesis de DNA y por consiguiente tiene un papel importante en la proliferación celular.



**Figura R11. El silenciamiento de CHD6 causa una ralentización en la progresión de la fase S.**

Células HEK293T fueron transfectadas con el silenciador de CHD6 (siCHD6\_ex30.1) y TM, y 48h después fueron incubadas (durante 1h) con bromodesoxiuridina (BrdU) según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (ver pág.). Posteriormente las células fueron recolectadas a los tiempos indicados, marcadas con un anticuerpo anti-BrdU-FITC y posteriormente teñidas con yoduro de propidio (IP) para analizar el ciclo celular mediante FACS. Los valores representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM. Diferencias significativas mediante t-test ( $p < 0.05$ ).

### III. INTERACCIÓN DE CHD6 Y SUS CROMODOMINIOS CON MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS

Actualmente más de un centenar de modificaciones post-traduccionales (PTMs) de histonas han sido descritas, y se sabe que funcionan en gran medida reclutando factores reguladores a la cromatina, los cuales a su vez dirigen procesos como la transcripción, replicación y reparación del DNA (Kouzarides, 2007a). De la misma forma, se han identificado docenas de factores que se asocian a cromatina uniéndose a PTMs concretos. Por otro lado el desarrollo de numerosos anticuerpos que reconocen modificaciones de histonas específicas están permitiendo explorar la función *in vivo* de estas modificaciones (Seet et al., 2006).

El principal obstáculo para comprender como las PTMs regulan los procesos mediados por cromatina, se debe a la enorme cantidad de combinaciones potenciales de PTMs, que hasta ahora ha limitado la capacidad tecnológica para desarrollar herramientas adecuadas para los estudios epigenéticos.

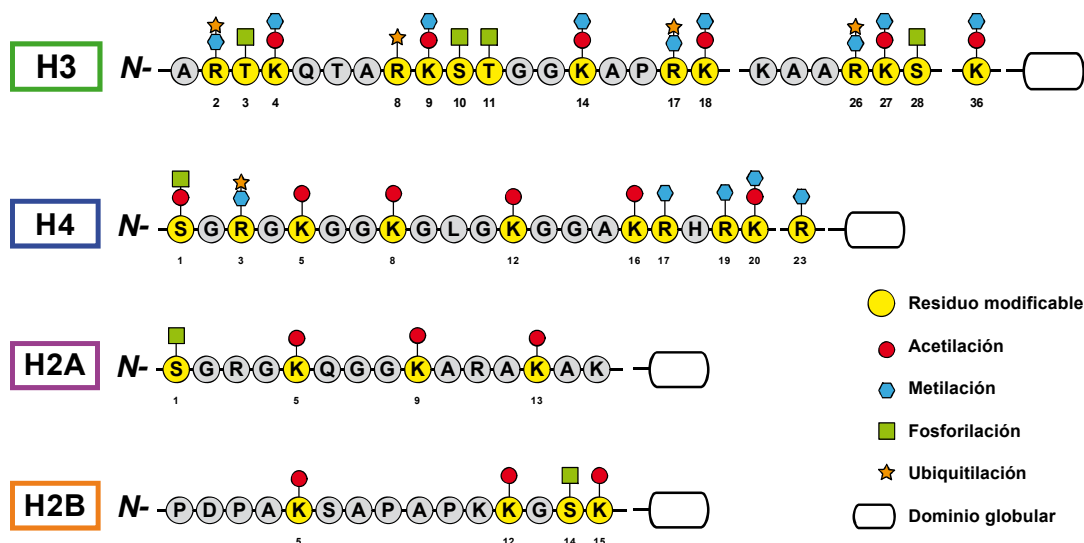
En esta tesis nos hemos propuesto identificar las modificaciones post-traduccionales de las colas N-terminal de histonas que son reconocidas tanto por CHD6 y sus posibles complejos asociados, como por sus cromodominios (que potencialmente unen PTMs de histonas). Para abordar este objetivo hemos utilizado una técnica novedosa que permite hacer un *screening* entre 59 modificaciones post-traduccionales de las colas N-terminales, mediante un *array* que contiene 384 péptidos con distintas combinaciones de modificaciones representativas de H3, H4, H2A y H2B, anclados covalentemente a una matriz de puntos de celulosa (**figura R12**). Esta técnica es sencilla (similar a un *Western-Blot*) y se basa en detectar fácilmente interacciones proteína-residuo modificado, con una alta sensibilidad (interacciones con bajas constantes de unión) por medio de quimioluminiscencia (*ECL*). A partir del film revelado para detectar por ECL, se obtiene una imagen con las intensidades de unión, las cuales son cuantificadas y procesadas mediante un programa informático de análisis proporcionado por la casa comercial. Dicho programa, permite realizar una cuantificación relativa de las interacciones proteína-residuo modificado y calcula automáticamente un coeficiente de interacción específica (*specificity factor*), el cual toma en cuenta el efecto de las posibles interacciones entre una modificación particular y las modificaciones adyacentes y nos permite determinar el grado de interacción específica entre la proteína-modificación (ver Materiales y Métodos).

Para analizar la influencia que modificaciones adyacentes puedan tener sobre una modificación particular, el programa informático calcula un cociente a partir de las señales de aquellos péptidos que contienen determinada modificación y que se consideran como

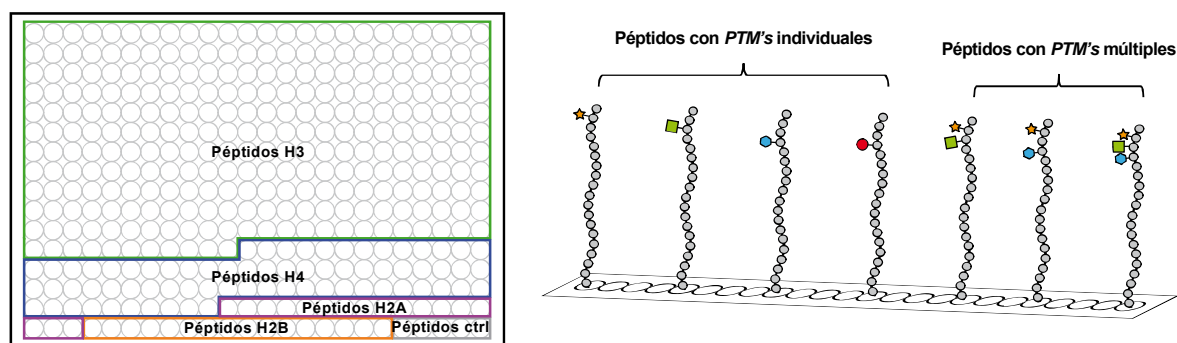


interacciones positivas (cuyos valores están por encima de un umbral que se establece arbitrariamente) entre la señal total de los péptidos que no contienen dicha modificación y que se consideran negativos de interacción (por debajo del umbral). Este cociente, por lo tanto, toma en cuenta las interacciones potenciales, tanto sinérgicas (que aumentan la interacción) como antagónicas (que disminuyen la interacción) de modificaciones adyacentes a la PTM en cuestión (ver Materiales y Métodos).

### Modificaciones postraduccionales de las colas de histonas



### Array de péptidos modificados de histonas



**Figura R12. Array de péptidos modificados de histonas.**

(Sup.) Modificaciones post-traduccionales de las colas N-terminal de las histonas *core* del nucleosoma (H3, H4, H2A y H2B) presentes en el array comercial de péptidos modificados de histonas (*MODified™ Histone Peptide Array*). (Inf.) Dicho array contiene 384 péptidos con modificaciones individuales o múltiples que permiten hacer un screening de 59 modificaciones de histonas (acetilaciones, metilaciones, citrulinaciones y fosforilaciones) siendo la herramienta actual con la mayor cobertura de modificaciones de histonas. Los péptidos contenidos en el array tienen una longitud de 19 residuos y se encuentran anclados covalentemente en su extremo C-terminal a una matriz de puntos de celulosa (*cellspot*).

### III.1 CHD6 y su interacción con modificaciones de histonas

#### III.1.1 Expresión e inmunopurificación de CHD6 endógena

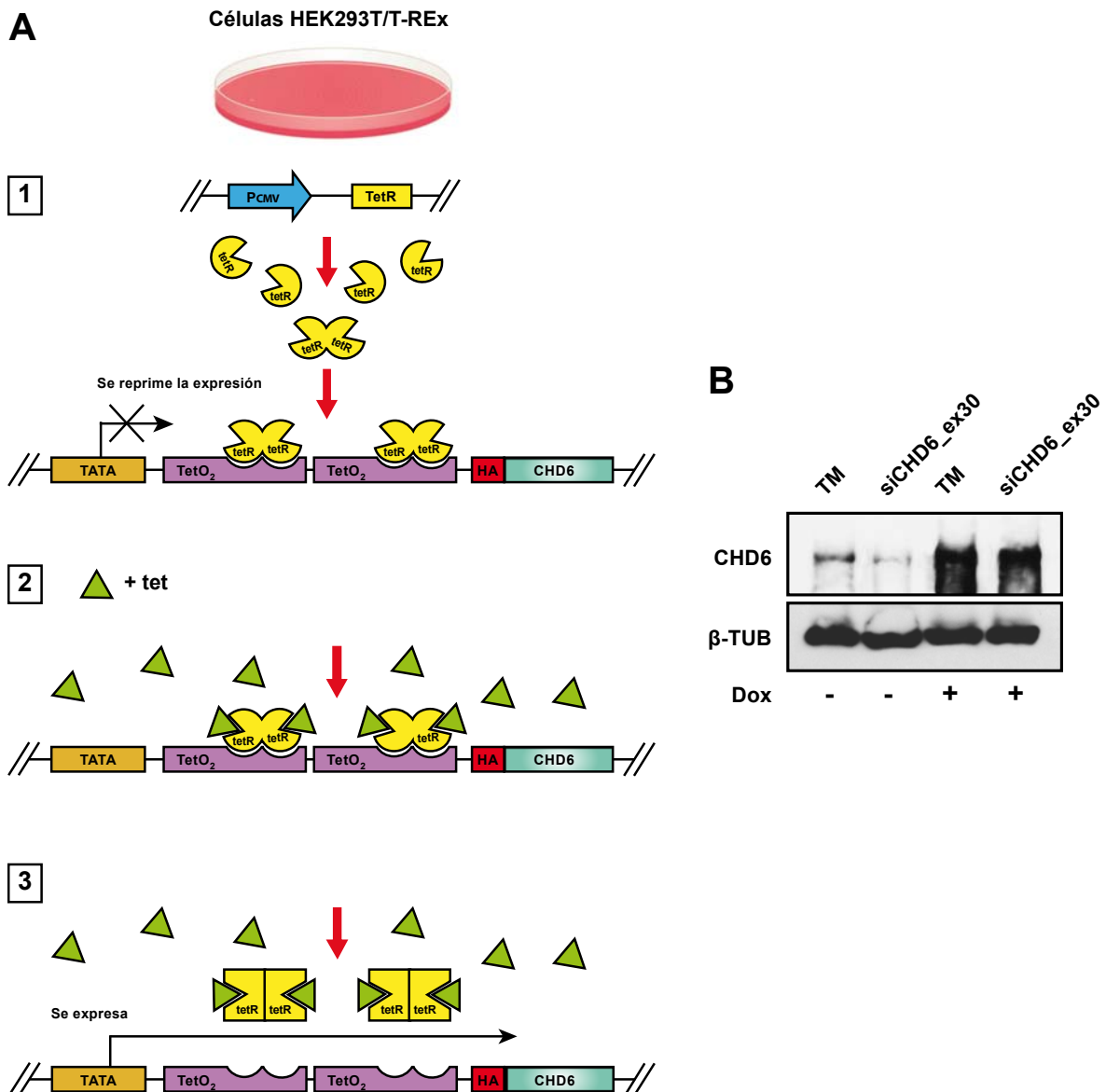
Para estudiar la posible interacción de CHD6 con modificaciones post-traduccionales de histonas, hemos llevado a cabo un experimento *in-vitro* en el que probamos la unión de la proteína CHD6 endógena fusionada a un *tag* de HA e inmunopurificada con el *array* de péptidos de histonas, mencionado anteriormente. Resultados previos de nuestro laboratorio (Lutz et al., 2006) sugieren que la proteína HA-CHD6 expresada en células HEK293T/T-Rex) tiene una función biológica similar a la proteína CHD6 endógena, puesto que tiene un patrón de localización subcelular similar al que muestra CHD6; restringido a nucleoplasma y de forma granular, y muestra una actividad ATPasa dependiente de DNA, que es abolida cuando se muta el dominio ATPasa/Helicasa de HA-CHD6. Esta actividad se ha descrito que es fundamental para la función remodeladora de cromatina de la familia CHD. Por tanto, es de esperar que aquellas modificaciones que interaccionen con la proteína endógena HA-CHD6 representen las interacciones con la proteína CHD6.

Para este objetivo se utilizó una línea celular estable HEK293T/T-REx que expresa de forma inducible por tetraciclina (sistema *Tet-On*) una forma no silenciada de CHD6 que contiene un *tag* de HA en su extremo N-terminal y que fue generada previamente en nuestro laboratorio mediante el sistema Flp-FRT/T-REx (Lutz et al., 2006). Estas células, como se ilustra en la **figura R13-A**, tienen integrado en su genoma, tanto el gen de HA-CHD6 que está bajo el control de un promotor regulado por tetraciclina (pCMV/TetO2), como el gen que expresa constitutivamente la proteína represora de tetraciclina (tetR). En condiciones de ausencia de tetraciclina (o su análogo doxiciclina) tetR se une al promotor TetO2 inhibiendo la expresión del gen HA-CHD6, en cambio en presencia de tetraciclina, ésta se une a tetR provocando un cambio alostérico que impide que se una al promotor TetO2, permitiendo así la expresión de HA-CHD6.

Células HEK293T/T-REx fueron transfectadas con los silenciadores siCHD6\_ex30.1/TM y 24h post-transfección se indujo la expresión de HA-CHD6 mediante la adición al medio con doxiciclina. A 24 h post-inducción, se analizaron los extractos celulares mediante *Western-Blot*. Como se observa en la **figura R13-B**, los extractos de células inducidas (Dox+) muestran una mayor acumulación de proteína CHD6 en comparación con las no inducidas (Dox-). Además se comprueba que la forma de HA-CHD6 expresada es no silenciada frente al silenciador siCHD6\_ex30.1.

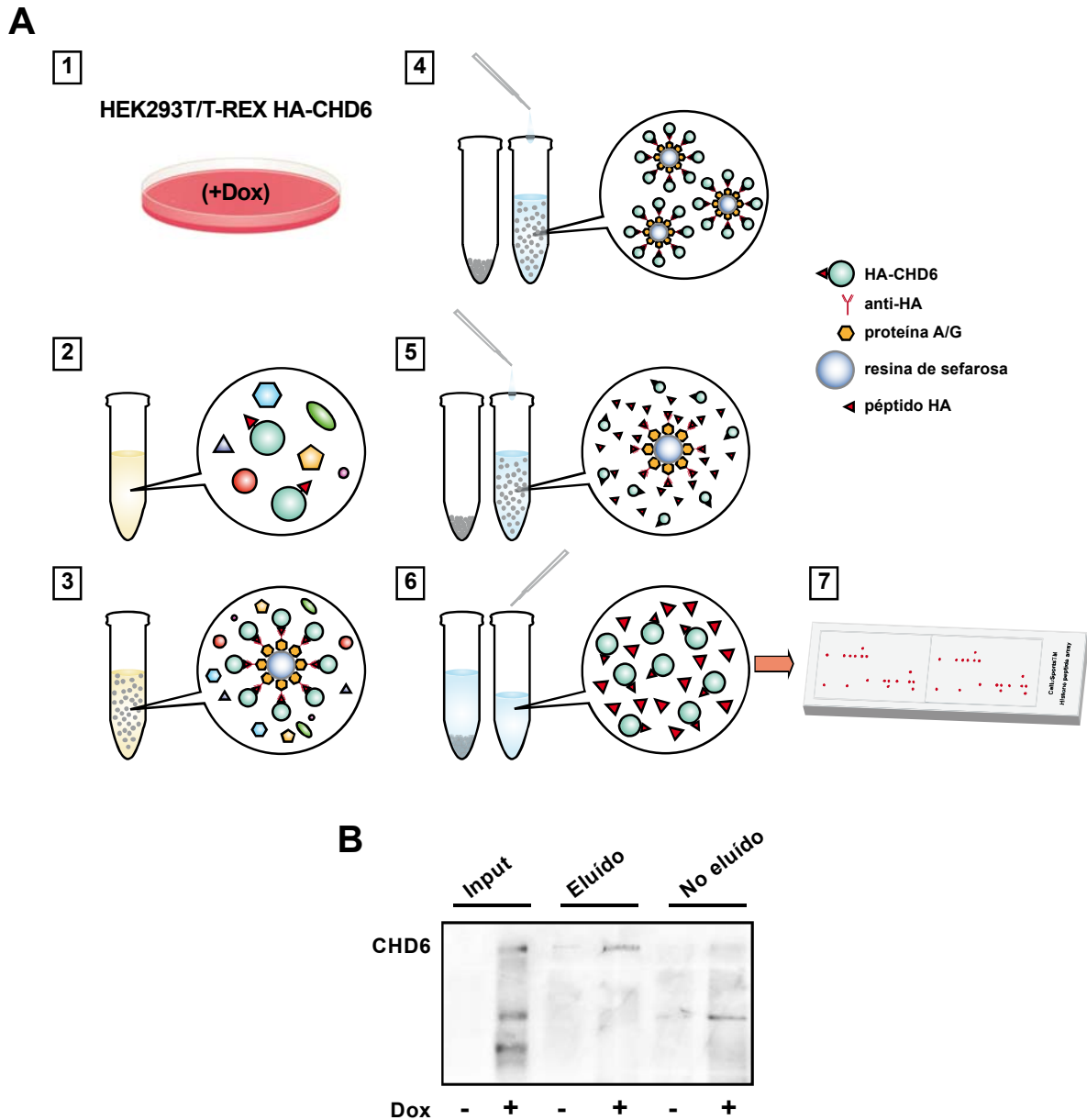
Una vez comprobada la expresión de HA-CHD6 en las células HEK293T/T-REx, procedimos a su purificación mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA y

elución de la proteína HA-CHD6 unida a la resina mediante competición con un péptido de HA, el mismo usado como inmunógeno para generar el anticuerpo anti-HA (**Figura R14-A**). Una parte de la proteína eluída fue destinada al ensayo de unión al *array* de péptidos modificados y otra parte fue utilizada para comprobar su elución mediante ensayo de *Western-Blot*. Como se muestra en la **figura R14-B** HA-CHD6 fue inmunoprecipitada y eluída a partir de extractos de células inducidas y también se observa la existencia de una pequeña proporción de HA-CHD6 que permanece unida a las resinas (no eluído).



**Figura R13. Expresión de HA-CHD6.**

(A) La expresión endógena de CHD6 basado en el sistema *tet-on*. 1) Células HEK293T/T-REx, que expresan constitutivamente la proteína represora de tet (*tetR*) tienen integrado en su genoma, el gen de CHD6 bajo el control de un promotor regulado por tetraciclina (*tet*). 2) Se agrega tetraciclina al sistema y 3) Se induce la expresión del gen HA-CHD6, mediante la liberación del promotor por la proteína represora. (B) Análisis de *Western-Blot* usando los anticuerpos anti-CHD6 y anti- $\beta$ -TUB como control de carga, a partir de lisados de células estables HEK293T/T-REx-HA-CHD6 mantenidas con los antibióticos adecuados a 48h post-inducción con doxiciclina (análogo de tetraciclina) siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.



**Figura R14. Inmunopurificación de HA-CHD6 endógena.**

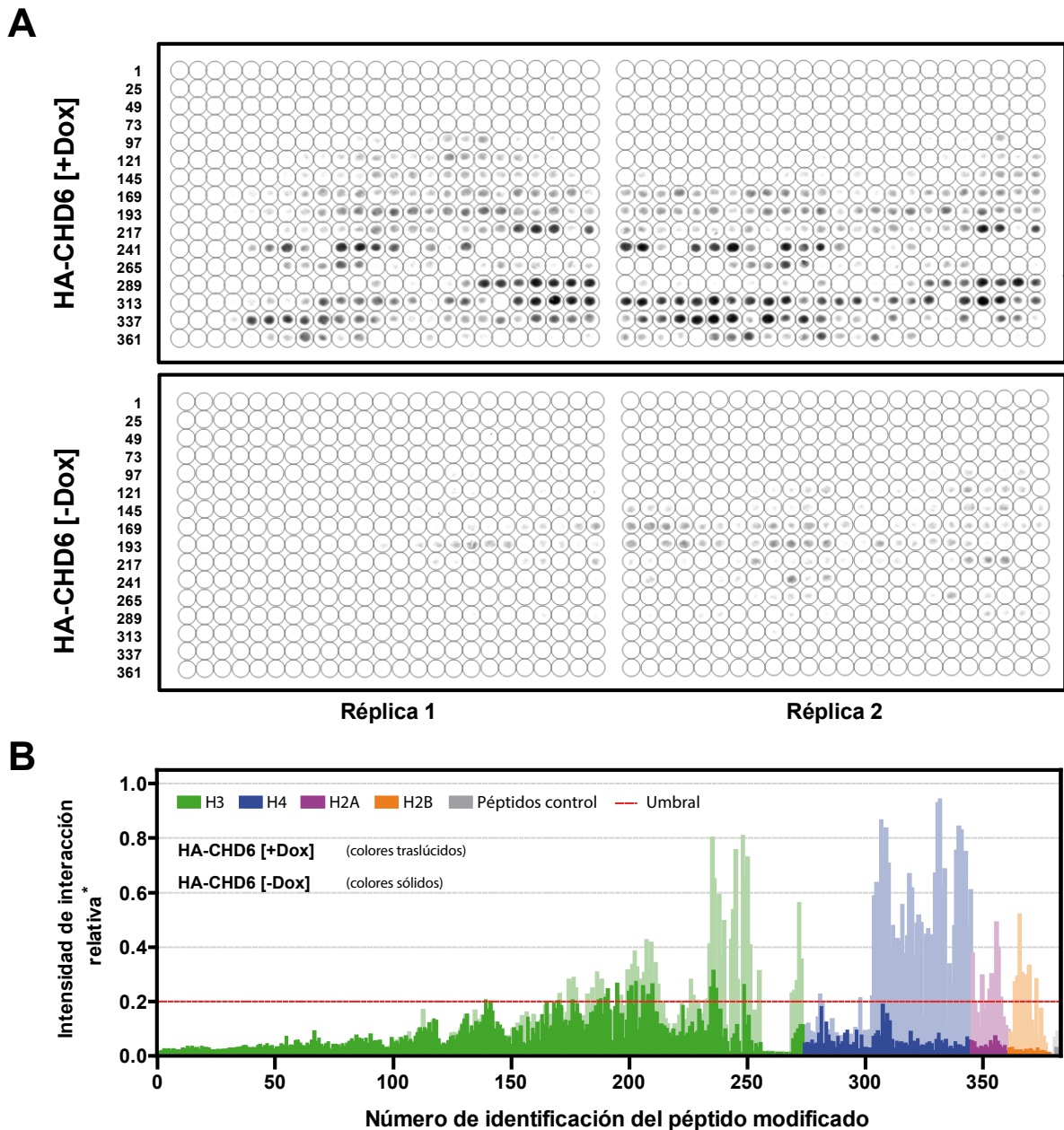
(A) sistema de purificación basado en la inmunoprecipitación de HA-CHD6. 1) Inducción de la expresión de HA-CHD6 en células estables HEK293T/T-REx-HA-CHD6 mediante doxiclina (Dox+). 2) se obtuvieron los lisados que contienen HA-CHD6 a 48h post-inducción. 3) los lisados fueron clarificados e incubados durante la noche con resinas de proteína G acopladas previamente con anticuerpo anti-HA. 4) Los complejos resina-anticuerpo-HA-CHD6 fueron lavados varias con buffer salino 5) Se eluyó HA-CHD6 de dichos complejos mediante competición con el péptido de HA. 6) se recuperó la fase líquida que contiene HA-CHD6. 7) Parte del eluido fue utilizado para la incubación en el *array* de péptidos de histonas. Lo anterior se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (B) Se obtuvieron los lisados de células HEK293T/T-REx-HA-CHD6 tanto inducidas (+Dox) como no inducidas (-Dox) y se siguió el proceso de inmunopurificación de HA-CHD6 antes mencionado con un anticuerpo anti-HA. Como resultado final, parte de las eluciones y las propias resinas (no eluido) fueron analizadas mediante *Western-Blot* usando un anticuerpo anti-CHD6.

### ***1.1.1 CHD6 interacciona con modificaciones individuales y combinatorias de las histonas H3 y H4***

La proteína HA-CHD6 purificada según hemos descrito, se usó para el ensayo de hibridación con el *array* de péptidos. Como control negativo se utilizó la elución obtenida a partir de células no inducidas y procesada de idéntica manera (-Dox). Las imágenes obtenidas de este experimento mostrando las intensidades de unión se presentan en la **figura 15-A**, en la que se observa una clara diferencia de intensidades entre lo unido a HA-CHD6 (+Dox) y HA-CHD6 (-Dox). Además se aprecia una muy buena relación señal específica/fondo y una gran reproducibilidad de los puntos de interacción entre las dos réplicas. Las intensidades de ambas imágenes (+Dox/-Dox) fueron cuantificadas y se muestran en la **figura 15-B**, en ella se observa interacción entre CHD6 y modificaciones específicas en las cuatro histonas, siendo las pertenecientes a la histona H4 las más abundantes y de mayor cantidad intensidad. Además de esto, algunas PTMs de las histonas H4 y H3 tienen una intensidad de unión superior o muy cercana a cinco veces el valor del umbral establecido por la señal del control (sin inducir) respectivamente. Por otro lado las PTMs reconocidas en las histonas H2A y H2B de mayor intensidad apenas supera en dos veces el valor del umbral. En conclusión HA-CHD6 posee una mayor interacción (tanto en número como en intensidad) con PTMs de H4 y H3 y muestra una interacción moderada con PTMs de H2A y H2B.

Para identificar las PTMs y residuos importantes para la unión de HA-CHD6 con las cuatro histonas nucleosomales, se elaboró una tabla (**Tabla 4**) en la que se muestran las PTMs tanto individuales como múltiples distribuidos en las cuatro histonas cuya intensidad de interacción relativa con HA-CHD6 es mayor al valor establecido para el umbral (19% del total). En ella, se puede observar que las dobles modificaciones en la histona H4 (R19me2a+K20me2,3) y (K20ac/me2,3+R24me2a) son los que poseen la mayor intensidad de unión a HA-CHD6 (>0.8).

Por otra parte, en la histona H3, las dobles modificaciones R26me2a+K27me1,2,3 son las de mayor interacción con HA-CHD6, aunque también las PTMs individuales R26me2a, K27me1,2,3 y K36me3 también presentan valores de unión superior a la señal de fondo. En la histona H2B, la modificación más importante para la unión a HA-CHD6 es K15ac, con una medida de interacción relativa de 0.56. Por último la doble modificación K9ac+K13ac de las histona H2A también parece interaccionar con HA-CHD6, sin embargo dado que su péptido control no modificado también tiene una medida de interacción superior al fondo, esto restaría especificidad a su unión con HA-CHD6.



**Figura R15. HA-CHD6 se une a determinadas modificaciones post-traduccionales de histonas.**  
**(A)** Se inmunopurificó HA-CHD6 endógena a partir de células HEK293T/T-REx-HA-CHD6, inducidas (+Dox) y no inducidas (-Dox) según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Una vez inmunopurificada la proteína HA-CHD6 fue utilizada para incubar en el *array* comercial de péptidos modificados de histonas (*MODified™ Histone Peptide Array*) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el *array* fue bloqueado previamente con leche al 5% y lavado con buffer salino, posteriormente se dejó incubar con HA-CHD6 durante la noche y se hicieron varios lavados con el mismo buffer, a continuación se incubó con un anticuerpo primario anti-HA, para luego ser incubado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La detección de las interacciones se hizo mediante ECL.  
**(B)** Las imágenes obtenidas de ambos *arrays* (+Dox/-Dox) fueron escaneadas y procesadas mediante el *software* proporcionado por el fabricante. (\*) Los valores representan la media ambas réplicas (n=2) normalizadas con la señal del péptido más alta.

Tabla 4. Lista de péptidos modificados que interaccionan con HA-CHD6 (IIR&gt;0.2)

Nº	#ID	HISTONA	PÉPTIDO	MODIFICACION/ES	I.I.R.
HA-CHD6					
1	334	H4	[11-30]	R19me2a + K20me3	1.000
2	333	H4	[11-30]	R19me2a + K20me2	0.955
3	342	H4	[11-30]	R24me2a + K20me3	0.904
4	343	H4	[11-30]	R24me2a + K20ac	0.899
5	341	H4	[11-30]	R24me2a + K20me2	0.805
6	311	H4	[11-30]	R19me2s	0.768
7	345	H4	[11-30]	R24me2s + K20me2	0.766
8	309	H4	[11-30]	R17me2s	0.762
9	336	H4	[11-30]	R19me2s + K20me1	0.705
10	332	H4	[11-30]	R19me2a + K20me1	0.687
11	310	H4	[11-30]	R17me2a	0.676
12	321	H4	[11-30]	K16ac + R17me2a	0.652
13	312	H4	[11-30]	R19me2a	0.651
14	335	H4	[11-30]	R19me2a + K20ac	0.648
15	322	H4	[11-30]	K16ac + R19me2s	0.635
16	347	H4	[11-30]	R24me2s + K20ac	0.623
17	307	H4	[11-30]	K12ac	0.613
18	318	H4	[11-30]	R24me2s	0.573
19	306	H4	[11-30]	No modificado	0.568
20	325	H4	[11-30]	K16ac + K20me2	0.541
21	326	H4	[11-30]	K16ac + K20me3	0.507
22	314	H4	[11-30]	K20me2	0.507
23	340	H4	[11-30]	R24me2a + K20me1	0.479
24	324	H4	[11-30]	K16ac + K20me1	0.479
25	346	H4	[11-30]	R24me2s + K20me3	0.470
26	329	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me2	0.467
27	308	H4	[11-30]	K16ac	0.464
28	330	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me3	0.452
29	320	H4	[11-30]	K16ac + R17me2s	0.452
30	328	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me1	0.448
31	316	H4	[11-30]	K20ac	0.429
32	317	H4	[11-30]	R24me2a	0.414
33	344	H4	[11-30]	R24me2s + K20me1	0.385
34	313	H4	[11-30]	K20me1	0.383
35	319	H4	[11-30]	K12ac + K16ac	0.369
36	315	H4	[11-30]	K20me3	0.362
37	323	H4	[11-30]	K16ac + R19me2a	0.358
38	338	H4	[11-30]	R19me2s + K20me3	0.341
39	339	H4	[11-30]	R19me2s + K20ac	0.269
40	247	H3	[16-35]	R26me2s + K27me3	0.725
41	252	H3	[16-35]	R26me2a + K27me3	0.656
42	250	H3	[16-35]	R26me2a + K27me1	0.614
43	251	H3	[16-35]	R26me2a + K27me2	0.603
44	237	H3	[16-35]	R26me2s	0.548
45	246	H3	[16-35]	R26me2s + K27me2	0.512
46	274	H3	[26-45]	K36me3	0.504
47	240	H3	[16-35]	K27me1	0.472
48	238	H3	[16-35]	R26me2a	0.451
49	242	H3	[16-35]	K27me3	0.446
50	245	H3	[16-35]	R26me2s + K27me1	0.409
51	253	H3	[16-35]	R26me2a + K27ac	0.395
52	241	H3	[16-35]	K27me2	0.332
53	257	H3	[16-35]	R26Cit + K27me3	0.294
54	275	H3	[26-45]	K36ac	0.269
55	205	H3	[1-19]	R2me2s + K4me2 + R8me2a + K9me3	0.258
56	248	H3	[16-35]	R26me2s + K27ac	0.256
57	209	H3	[1-19]	R2me2a + K4me2 + R8me2a + K9me3	0.224
58	213	H3	[1-19]	R2me2s + K4me2 + R8me2a + K9ac	0.204
59	273	H3	[26-45]	K36me2	0.200
60	368	H2B	[1-19]	K15ac	0.563
61	372	H2B	[1-19]	K12ac + S14P	0.345
62	369	H2B	[1-19]	K5ac + K12ac	0.324
63	371	H2B	[1-19]	K5ac + K15ac	0.309
64	367	H2B	[1-19]	S14P	0.307
65	375	H2B	[1-19]	K5ac + K12ac + S14P	0.285
66	366	H2B	[1-19]	K12ac	0.282
67	358	H2A	[1-19]	K9ac + K13ac	0.494
68	359	H2A	[1-19]	S1P + K5ac + K9ac	0.404
69	348	H2A	[1-19]	No modificado	0.368
70	352	H2A	[1-19]	K13ac	0.300
71	356	H2A	[1-19]	K5ac + K9ac	0.288
72	357	H2A	[1-19]	K5ac + K13ac	0.234
73	355	H2A	[1-19]	S1P + K13ac	0.213
74	360	H2A	[1-19]	S1P + K5ac + K13ac	0.209

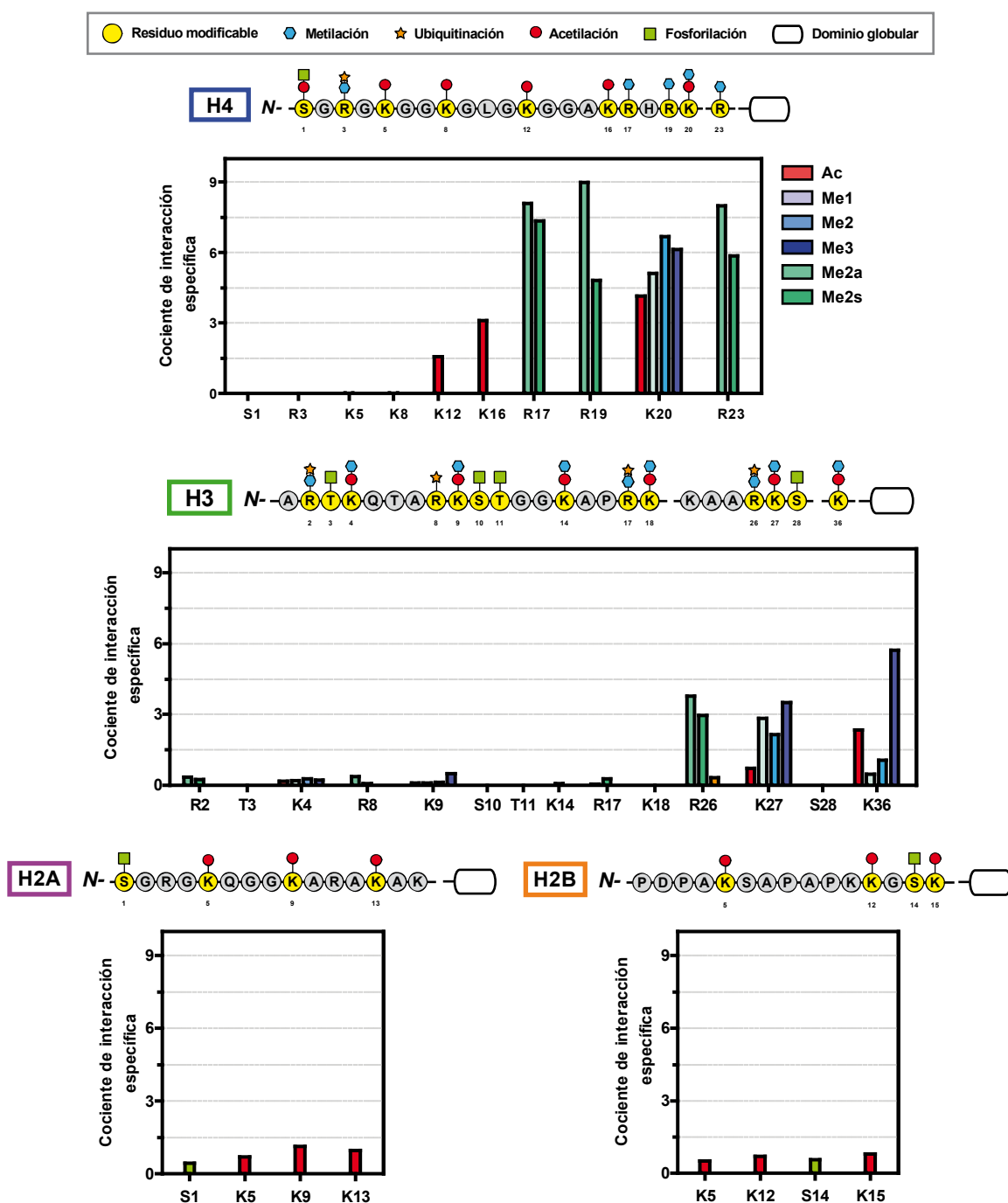
### ***I.1.2 CHD6 interacciona con modificaciones individuales y combinatorias de las histonas H3 y H4***

La proteína HA-CHD6 purificada según hemos descrito, se usó para el ensayo de hibridación con el *array* de péptidos. Como control negativo se utilizó la elución obtenida a partir de células no inducidas y procesada de idéntica manera (-Dox). Las imágenes obtenidas de este experimento mostrando las intensidades de unión se presentan en la **figura 15-A**, en la que se observa una clara diferencia de intensidades entre lo unido a HA-CHD6 (+Dox) y HA-CHD6 (-Dox). Además se aprecia una muy buena relación señal específica/fondo y una gran reproducibilidad de los puntos de interacción entre las dos réplicas. Las intensidades de ambas imágenes (+Dox/-Dox) fueron cuantificadas y se muestran en la **figura 15-B**, en ella se observa interacción entre CHD6 y modificaciones específicas en las cuatro histonas, siendo las pertenecientes a la histona H4 las más abundantes y de mayor cantidad intensidad. Además de esto, algunas PTMs de las histonas H4 y H3 tienen una intensidad de unión superior o muy cercana a cinco veces el valor del umbral establecido por la señal del control (sin inducir) respectivamente. Por otro lado las PTMs reconocidas en las histonas H2A y H2B de mayor intensidad apenas supera en dos veces el valor del umbral. En conclusión HA-CHD6 posee una mayor interacción (tanto en número como en intensidad) con PTMs de H4 y H3 y muestra una interacción moderada con PTMs de H2A y H2B.

Para identificar las PTMs y residuos importantes para la unión de HA-CHD6 con las cuatro histonas nucleosomales, se elaboró una tabla (**Tabla 4**) en la que se muestran las PTMs tanto individuales como múltiples distribuidos en las cuatro histonas cuya intensidad de interacción relativa con HA-CHD6 es mayor al valor establecido para el umbral (19% del total). En ella, se puede observar que las dobles modificaciones en la histona H4 (R19me2a+K20me2,3) y (K20ac/me2,3+R24me2a) son los que poseen la mayor intensidad de unión a HA-CHD6 (>0.8).

Por otra parte, en la histona H3, las dobles modificaciones R26me2a+K27me1,2,3 son las de mayor interacción con HA-CHD6, aunque también las PTMs individuales R26me2a, K27me1,2,3 y K36me3 también presentan valores de unión superior a la señal de fondo. En la histona H2B, la modificación más importante para la unión a HA-CHD6 es K15ac, con una medida de interacción relativa de 0.56. Por último la doble modificación K9ac+K13ac de las histona H2A también parece interaccionar con HA-CHD6, sin embargo dado que su péptido control no modificado también tiene una medida de interacción superior al fondo, esto restaría especificidad a su unión con HA-CHD6.





**Figura R16. HA-CHD6 se une específicamente a modificaciones en residuos de H4 y H3.**

Los 384 valores relativos de interacción provenientes del *array* de HA-CHD6, fueron usados para determinar el cociente de interacción específica mediante el *software* del fabricante. Dicho cociente (para una modificación particular) proviene de la señal media de los péptidos que contienen dicha modificación y cuyos valores se encuentra por encima de umbral determinado arbitrariamente, entre la señal media de los péptidos que contiene la marca y cuyos valores se encuentran por debajo del umbral. Por tanto, este cociente considera la influencia de las modificaciones adyacentes y permite distinguir individualmente las modificaciones que interaccionan con HA-CHD6.

### ***1.1.3 CHD6 se une a acetilaciones en K16 y K20 de la histona H4***

Además de las interacciones descritas anteriormente de CHD6 también se observa que se une específicamente a acetilaciones en K16 y K20 de la histona H4 (**Figura R16**) con coeficiente de interacción específica mayor a 3. Como se he mencionado en la introducción H4K16 se ha descrito como una marca canónica de transcripción activa. Se sabe que una reducción en los niveles de acetilación mediada por MOF (una HAT cuyo sustrato específico es H4K16) en *Drosophila* y *mamíferos*, provoca inestabilidad genética, anormalidades cromosómicas, defectos en el ciclo celular y una reducción en los niveles de transcripción (Taipale 2005; Hilfiker 1997; Gupta 2010). También se ha descrito que la pérdida completa de MOF conduce a una severa parada en la fase G2/M del ciclo celular, aberraciones cromosómicas masivas y defectos en la reparación de daño al DNA inducido con radiaciones ionizantes. Estos y otros datos indican que la acetilación de H4K16 juega un papel crucial en la embriogénesis, tumorigénesis, proliferación celular y reparación del DNA (Gupta 2008; Li 2010).

Por otro lado, CHD6 también interacciona específicamente con H4K20ac, con un coeficiente de 4,6. Se ha descrito recientemente que esta marca de acetilación es reconocida por el bromodominio (BrD) que forma parte del factor de transcripción humano CBP, mediante la determinación de la estructura de CBP con péptidos acetilados de histona H4 mediante cristalografía (Plotnikov 2014; Zeng 2008). La unión del bromodominio a lisinas acetiladas modula la apertura de la cromatina, y facilita el reclutamiento de factores de transcripción a sus sitios diana en los promotores y regiones *enhancer* y promueve el ensamblaje y activación de la RNAPII (Chiang 2009).

Por tanto podemos concluir que CHD6 formando parte de complejos multiproteicos une específicamente acetilaciones en los residuos K16 y K20 de la histona H4, los cuales tienen un función clara en los procesos de transcripción activa.

### ***1.1.4 CHD6 se une a metilaciones en residuos K20, R17, R19 y R24 de H4, así como también en K27, K36 y R26 de H3***

Siguiendo con el análisis de las interacciones de CHD6 con PTMs, se observa que HA-CHD6 interacciona específicamente con metilaciones en residuos de lisina (H4K20, H3K27, H3K36) y arginina (H4R17, 19, 23; H3R26) de las histonas H4 y H3. A diferencia de las acetilaciones, que generalmente constituyen marcas de activación transcripcional, las metilaciones tienen funciones que dependen del residuo y de su grado de metilación, pudiendo estar enriquecidas en dominios genómicos completamente distintos. Además de esto, la metilación de argininas, puede ser simétrica o asimétrica, añadiendo más complejidad al sistema.

En la **figura R16**, se observa que CHD6 se une específicamente a la lisina K20 de H4; di-, mono- y tri-metiladas (en orden decreciente de especificidad). Se ha descrito que de los tres estados de metilación, la forma más abundante es H4K20me<sub>2</sub>, mientras que H4K20me<sub>3</sub> y H4K20me son poco abundantes y constituyen formas transitorias que posteriormente se convierten en formas dimetiladas. Análisis inmuno-químicos, han asociado H4K20me<sub>2</sub> a una diversidad de funciones, como mitosis (Julien 2004), reparación del DNA (Botuyan 2006; Sakaguchi 2007; Sanders 2004; Greeson 2008; Pei 2011), regulación epigenética de la transcripción (Nishioka 2002), mantenimiento de la heterocromatina (Shotta 2004) y condensación de la cromatina (Yasuhiro 2012). Datos contradictorios relacionados con diferencias en la especificidad de los anticuerpos (Spada 2005) sugieren distintas metilasas específicas de H4K20 (Fang 2002; Nishioka 2007).

Por otro lado, las metilaciones en los residuos R19 y R23 de la histona H4, únicamente han sido descritas en espermatozoides de ratón. La metilación en R17 hasta ahora no ha sido descrita. No obstante, estudios recientes han sugerido que la combinación de la triple marca H4R19me<sub>2</sub>-K20me<sub>2</sub>-R23me<sub>2</sub> es reconocida específicamente por la proteína receptora de laminina B (LBR, *Laminin B Receptor*) cuyo función es importante para la compactación de la cromatina y la represión transcripcional.

Otras metilaciones a las que se une HA-CHD6, aunque en menor grado son H3K27me<sub>3</sub> y H3K36me<sub>3</sub>. Mientras que H3K27me<sub>3</sub> ha sido descrita como una marca clásica de represión transcripcional, la metilación en H3K36 ha sido asociada con transcripción activa, y más concretamente con la elongación transcripcional, por tanto ambas marcas son antagónicas. De acuerdo con esto, se ha demostrado ambas marcas raramente co-existen en la misma histona y además existen datos que demuestran que la metilación específica de H3K27 mediada por la enzima metiltransferasa PRC es inhibida en nucleosomas que contienen H3K36 metilado.

Por último, HA-CHD6 se une a la dimetilación tanto simétrica o como asimétrica de H3R26, sin embargo la información existente de esta modificación es escasa, no obstante ha sido implicada en la activación transcripcional mediada por el receptor nuclear (NR) y en la regulación de genes que confieren la pluripotencia durante el desarrollo temprano de ratón (Koh 2001; Torres-Padilla 2007).

H4	K12ac	K16ac	K12ac +K16ac	R17me2a	R17me2s	R19me2a	R19me2s	K20ac	K20me1	K20me2	K20me3	R23me2a	R23me2s
mod. Ind.	0.67	0.51	0.39	0.76	0.92	0.75	0.89	0.45	0.42	0.50	0.39	0.44	0.58
+K12ac		0.39											
+K16ac	0.39			0.70	0.46	0.38	0.65	0.14	0.51	0.54	0.51		
+K12ac+K16ac								0.02	0.47	0.49	0.46		
+R17me2a		0.70											
+R17me2s		0.46											
+R19me2a		0.38						0.66	0.71	0.99	1.00		
+R19me2s		0.65						0.27	0.72	0.10	0.35		
+K20ac		0.14	0.02			0.66	0.27					0.88	0.64
+K20me1		0.51	0.47			0.71	0.72					0.50	0.39
+K20me2		0.54	0.49			0.99	0.10					0.80	0.79
+K20me3		0.51	0.46			1.00	0.35					0.89	0.50
+R23me2a								0.88	0.50	0.80	0.89		
+R23me2s								0.64	0.39	0.79	0.50		

H3	R26me2s	R26me2a	R26Cittr	K27me1	K27me2	K27me3	K27ac	K36me1	K36me2	K36me3	K36ac
mod. Ind.	0.85	0.68	0.10	0.62	0.38	0.52	0.11	0.24	0.28	0.59	0.37
+R26me2s				0.45	0.56	0.80	0.29				
+R26me2a				0.86	0.68	0.77	0.43				
+R26Cittr				0.17	0.10	0.32					
+K27me1	0.45	0.86	0.17								
+K27me2	0.56	0.68	0.10								
+K27me3	0.80	0.77	0.32								
+K27ac	0.29	0.43									

**Figura R17. Modificaciones adyacentes en H4 y H3 cooperan sinérgicamente en la unión a HA-CHD6.**

Tabla que muestra los valores relativos de interacción, provenientes del *array* entre HA-CHD6 y una selección de modificaciones individuales y combinatorias en H4 y H3, en residuos relevantes en la unión a HA-CHD6. Para distinguir y facilitar visualmente el efecto entre las modificaciones adyacentes se muestran en diferentes tonalidades de azul, los valores relativos de interacción que se encuentran por encima del umbral, mientras que las tonalidades en rojo representan los valores que se encuentran por debajo del umbral. En color gris se indican aquellas combinaciones que no se encuentran en el *array*.

## 1.1.5 Interacción entre modificaciones adyacentes de histonas en la unión a CHD6

Dada la hipótesis del código de histonas y con ello las múltiples combinaciones de residuos modificados que pueden coexistir, es de vital importancia analizar las posibles interacciones entre los remodeladores de cromatina y las posibles secuencias combinatorias de las colas N-terminal de las histonas. El uso del *array* de péptidos modificados, nos permite conocer algunas de las posibles modificaciones combinatorias que pueden tanto aumentar como disminuir la unión con el remodelador de cromatina CHD6.

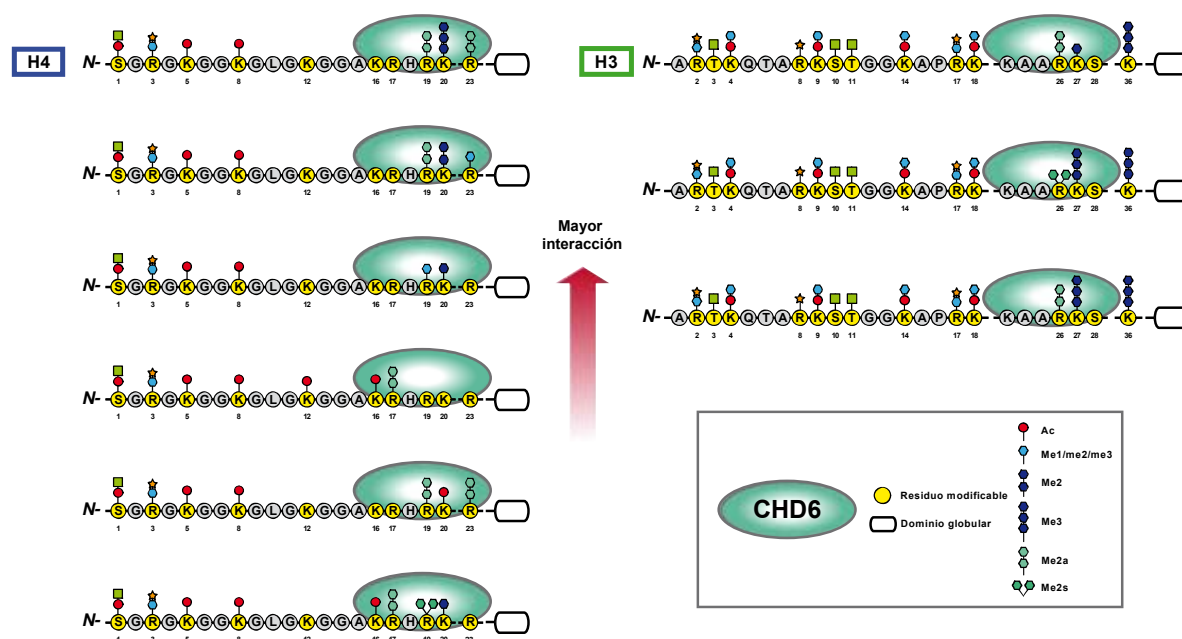
Tomando en cuenta lo anterior, en la **figura R17** se muestra un mapa de colores, para las histonas H4 y H3, que representa las intensidades de interacción relativa para una selección de modificaciones individuales y el efecto que tiene en su interacción cuando se añaden modificaciones adyacentes (dicha selección se hizo tomando en cuenta aquellas modificaciones individuales relevantes en su interacción específica con HA-CHD6).

Para la histona H4, se pueden distinguir tres fenómenos: 1) que la doble modificación R19me2a+K20me2/3 presenta la interacción más fuerte con HA-CHD6, y además

comparando sus uniones individuales, se observa que ambas modificaciones cooperan sinérgicamente a la unión 2) las dobles modificaciones K20me2/3+R23me2a y K20ac+R23me2a cooperan de la misma forma que R19me2a+K20me2/3; y 3) la interacción de HA-CHD6 con la doble modificación K16ac+R17me2a, es también una de las más intensas, sin embargo respecto a K16ac, la presencia de modificaciones adyacentes a ésta en los residuos K12, R17, R19 y K20 parecen afectar de manera negativa su unión a HA-CHD6, con la única excepción, de la metilación en K20

Por último cabe destacar que la interacción de HA-CHD6 con K20me2/3 se ve influenciada de forma muy negativa por R19me2s, por tanto esto sugiere que la unión de HA-CHD6 a la metilación en el residuo R19 es sensible y antagónica, dependiendo de si se trata de una dimetilación simétrica o asimétrica.

En la **figura R18**, se presenta un esquema que resume el conjunto de modificaciones combinatorias de las histonas H3 y H4 que unen HA-CHD6



**Figura R18. HA-CHD6 interacciona con modificaciones combinatorias de H4 y H3.**

De forma resumida y de acuerdo a los análisis tanto de interacción específica como modificaciones adyacentes, se muestran solamente las modificaciones combinatorias en las histonas H4 y H3 que interaccionan con HA-CHD6 con un valor relativo >0.7; las cuales se encuentran ordenadas de mayor a menor interacción.

### I.2 Hi-cromodominios de CHD6

El reconocimiento de modificaciones de histonas por los cromodominios de la familia CHD, está muy pobremente caracterizado y únicamente se ha descrito la capacidad de los cromodominios CHD1 y CHD2 de unirse a metilaciones de histonas (Flanagan et al., 2005, Flanagan et al., 2007).

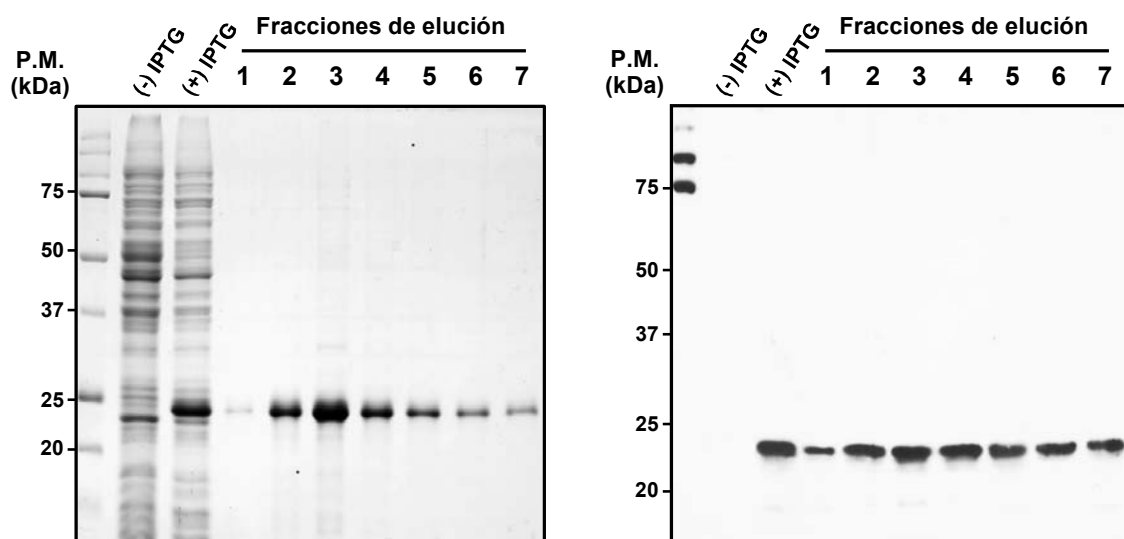
Uno de los objetivos de esta tesis, ha consistido en examinar la posible contribución de los cromodominios CHD6 en la unión a determinadas modificaciones de histonas y para ello se ha utilizado la técnica del *array* de péptidos modificados de histonas.

#### I.2.1 Expresión y purificación de los cromodominios de CHD6

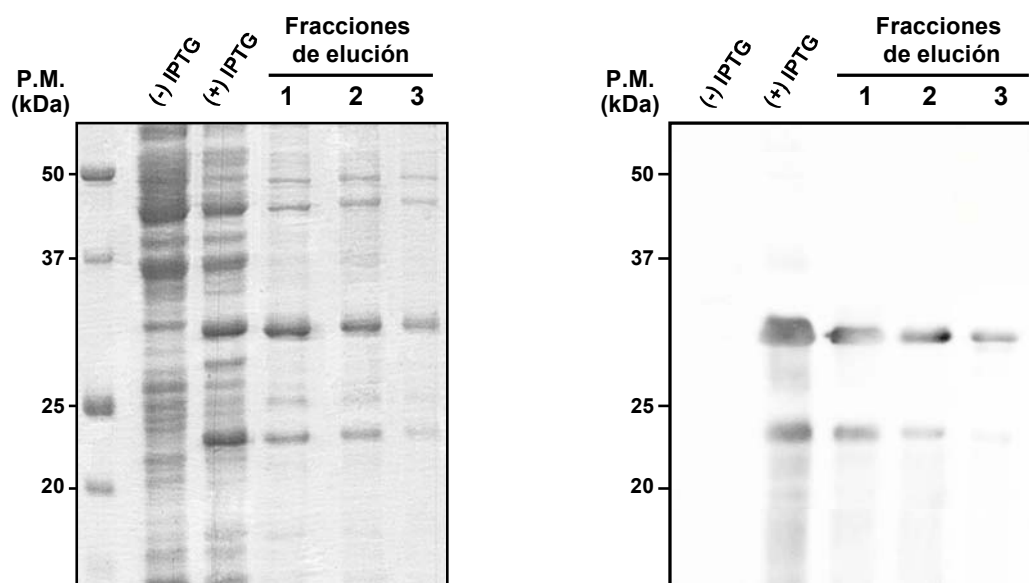
Para ello se clonó en el vector de expresión bacteriano pETM-11, el cDNA correspondiente a los dos cromodominios de CHD6 (aa 289-434), downstream a la región codificante de un tag N-terminal de poli-histidina (6xHis) que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad a resinas de  $\text{Ni}^{+2}$  según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los His-cromodominios purificados eluidos de la columna de afinidad fueron dializados y utilizados para el ensayo de unión a modificaciones de histonas, mediante el *array* descrito anteriormente. De manera adicional, se expresó y purificó una proteína conteniendo también un tag de histidinas en el extremo amino-terminal (His-hCLE), mediante un protocolo similar al anterior, como un posible control negativo de unión a modificaciones de histonas de otra His-proteína.

La expresión y purificación de los His-cromodominios e His-hCLE fue analizada mediante tinción con azul de Coomassie y análisis de *Western-Blot*. Como se observa en la **figura R19-A**, el Coomassie de los His-cromodominios muestra una banda enriquecida en el input de células inducidas (IPTG+) respecto a las no inducidas (IPTG-), con un tamaño cercano a los 25kDa, que representa la única proteína presente en las fracciones de elución de la resina de  $\text{Ni}^{2+}$  y que dio positivo en ensayos de *Western-Blot* usando un anticuerpo anti-poli-histidina. Por otro lado, el análisis del input de células inducidas (+IPTG) para His-hCLE muestran la existencia de dos bandas enriquecidas mediante Coomassie; la primera con un tamaño entre 25-37kDa y la segunda entre 20-25kDa (**Figura R19-B**) que posiblemente represente la proteína His-hCLE parcialmente degradada. Ambas bandas resultaron positivas en el ensayo de *Western-Blot*, utilizando un anticuerpo anti-poli-histidina.

## His-cromodominios de CHD6

**A****B**

## His-hCLE

**Figura R19. His-cromodominios de CHD6 e His-hCLE purificados.**

**(A)** (*Izq.*) Análisis por tinción de azul Coomassie en gel de acrilamida 12%, de distintas fracciones de elución obtenidas mediante la purificación de los His-cromodominios de CHD6 mediante resinas de  $\text{Ni}^{2+}$ , según lo descrito en Materiales y Métodos (*Der.*) Análisis de *Western-Blot*, de las fracciones purificadas de los His-cromodominios usando el anticuerpo anti-poli-histidina. **(B)** Similar a (A) pero para His-hCLE.

### ***1.2.2 Los cromodominios de CHD6 se unen principalmente a modificaciones combinatorias en H4 y H2B***

Los His-cromodominios de CHD6 y la proteína His-hCLE purificados y utilizados para el ensayo de unión a modificaciones de histonas. Los resultados obtenidos de este ensayo mostrando las intensidades de unión tanto de los His-cromodominios como His-hCLE se presentan en la **figura R20-A**. En ella podemos distinguir claramente puntos positivos de interacción de los cromodominios respecto al fondo, siendo los puntos positivos muy reproducibles entre ambas réplicas. En el *array* de His-hCLE a diferencia de los His-cromodominios, se observan puntos de interacción de baja intensidad muy variables entre las dos réplicas.

La cuantificación relativa de las intensidades de interacción de ambos *arrays*, His-cromodominios e His-hCLE, se realizó de la misma forma descrita anteriormente para el *array* de la proteína HA-CHD6 endógena. Los resultados se muestran en la **figura R20-B**, en ella se observa que las modificaciones que interaccionan con los His-cromodominios de CHD6 con mayor número e intensidad son las que pertenecen a la histona H4. Mientras que la histona H2B, presenta sólo dos modificaciones que interaccionan con los His-cromodominios, siendo una de ellas la que registra la mayor intensidad de interacción. Respecto a las modificaciones que interaccionan con His-hCLE, observamos que la mayoría de ellas (en la histona H3) tienen intensidades de interacción por debajo del fondo (0.2) y no representan interacciones específicas.

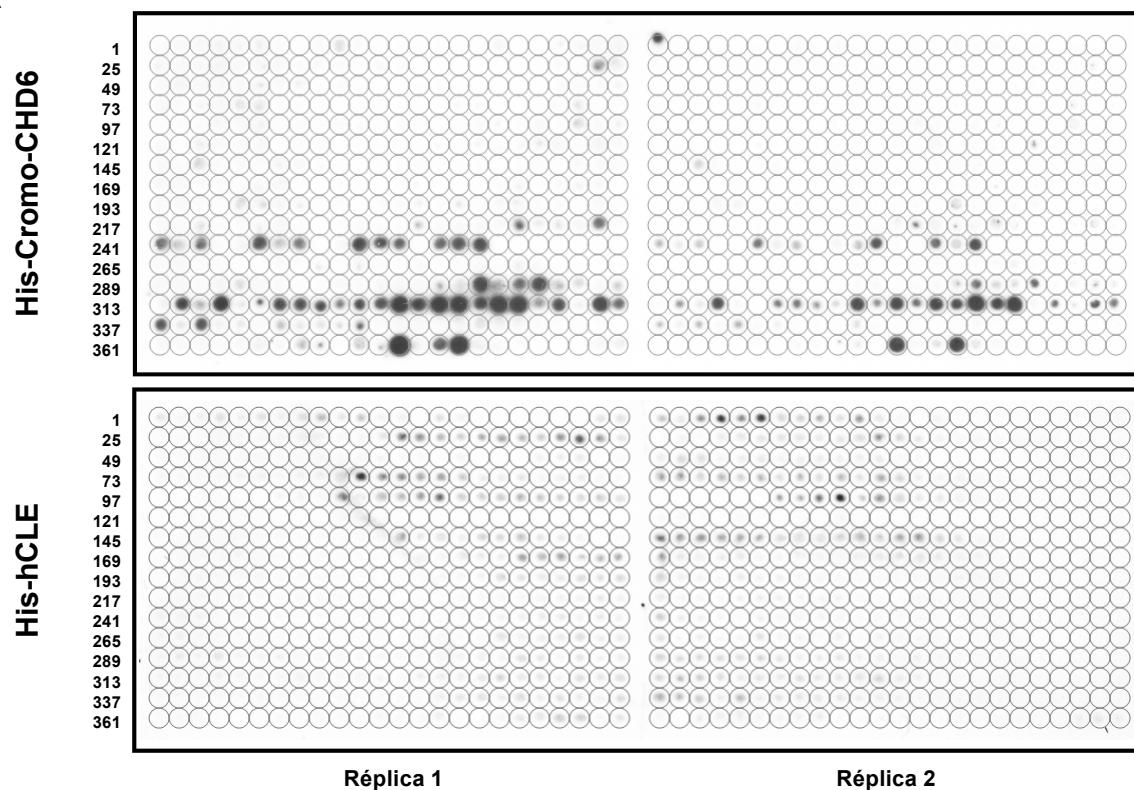
En la **tabla 5**, se muestra una lista de los péptidos modificados que interaccionan con los His-cromodominios de CHD6, con un valor de intensidad superior al fondo (4.2% del total de péptidos analizados). En ella se observa que la doble y triple acetilación de la histona H2B, en los residuos K5,12 y 15 son los que presentan la mayor intensidad de interacción. En la histona H4, la triple acetilación en las posiciones K12,16 y 20, y la doble modificación K16ac+K20ac/me2 son las modificaciones que interaccionan mayormente con los His-cromodominios de CHD6. Estos datos indican que los cromodominios de CHD6 unen preferiblemente dobles y triples modificaciones en comparación a las modificaciones individuales.

En el área de la epigenética es ampliamente aceptado que la acetilación de las histonas tiene un papel en la activación transcripcional, mientras que la función biológica de la metilación, depende de factores como la posición, el grado de metilación y la combinación con otras modificaciones (tal es el caso extremo de H3K4me3 y H3K27me3, cuyas funciones canónicas en la transcripción son antagónicas). Por ello a continuación se

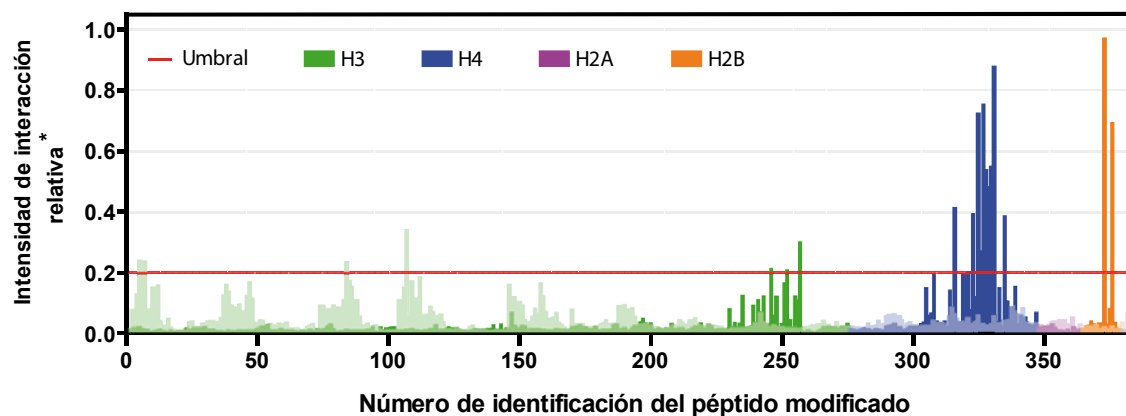


analizará primero la interacción de los His-cromodominios con las acetilaciones o activación transcripcional y posteriormente la interacción con las metilaciones.

**A**



**B**



**Figura R20. Los cromodominios de CHD6 se unen a determinadas modificaciones post-traduccionales de histonas.**

(A) (*Sup.*) Se purificaron los cromodominios de CHD6 mediante resinas de  $\text{Ni}^{2+}$  según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las fracciones de elución obtenidas fueron utilizadas para incubar en el *array* comercial de péptidos modificados de histonas (*MODified™ Histone Peptide Array*) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el *array* fue bloqueado previamente con leche al 5% y lavado con buffer salino, posteriormente se dejó incubar con los His-cromodominios durante la noche y se hicieron varios lavados con el mismo buffer, a continuación se incubó con un anticuerpo primario anti-poli-Histidina acoplado a peroxidasa. La detección de las interacciones se hizo mediante ECL. (*Inf.*) Similar a (*Sup.*) pero para His-hCLE. (B) Las imágenes obtenidas de ambos *arrays* (His-cromodominios/His-hCLE) fueron escaneadas y procesadas mediante el *software* proporcionado por el fabricante. (\*) Los valores representan la media ambas réplicas ( $n=2$ ) normalizadas con la señal del péptido más alta.

**Tabla 5. Lista de péptidos modificados que interaccionan con los cromodominios de CHD6 (IIR>0.2)**

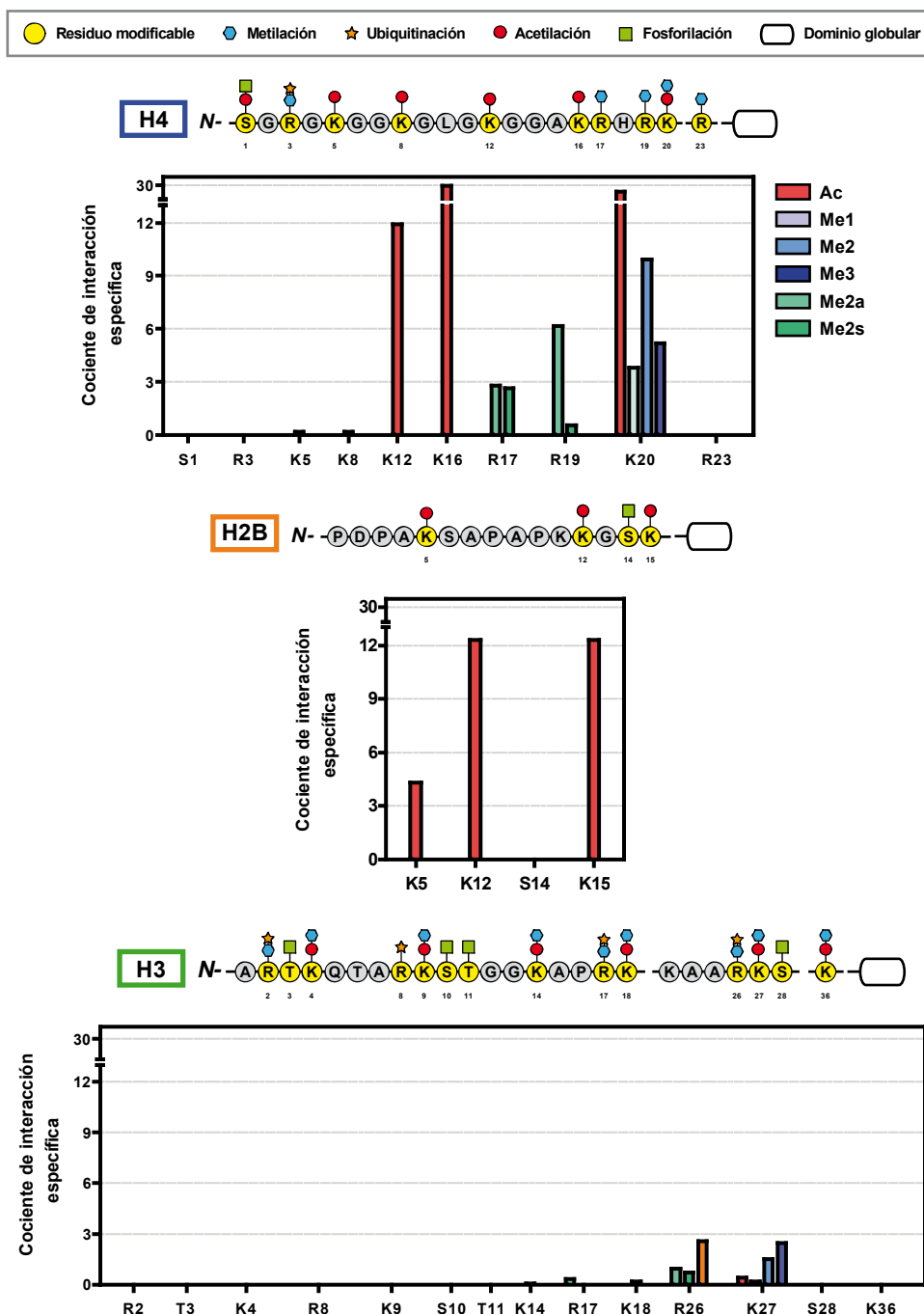
Nº	#ID	HISTONA	PÉPTIDO	MODIFICACION/ES	I.I.R.
<b>His-cromo-CHD6</b>					
1	373	H2B	[1-19]	K12ac + K15ac	0.971
2	376	H2B	[1-19]	K5ac + K12ac + K15ac	0.693
3	331	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20ac	0.877
4	327	H4	[11-30]	K16ac + K20ac	0.753
5	325	H4	[11-30]	K16ac + K20me2	0.723
6	330	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me3	0.550
7	328	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me1	0.538
8	329	H4	[11-30]	K12ac + K16ac + K20me2	0.482
9	316	H4	[11-30]	K20ac	0.413
10	323	H4	[11-30]	K16ac + R19me2a	0.393
11	335	H4	[11-30]	R19me2a + K20ac	0.385
12	326	H4	[11-30]	K16ac + K20me3	0.271
13	321	H4	[11-30]	K16ac + R17me2a	0.203
14	257	H3	[16-35]	R26Citr + K27me3	0.301
15	246	H3	[16-35]	R26me2s + K27me2	0.213
16	252	H3	[16-35]	R26me2a + K27me3	0.209

### ***1.2.3 Los cromodominios de CHD6 se unen específicamente a acetilaciones en los residuos K12/16/20 de H4 y K5/12/15 de H2B***

De manera análoga a la utilizada para las interacciones de HA-CHD6, se determinó el cociente de interacción específica, el cual nos permite conocer el grado de unión entre una modificación particular y los His-cromodominios de CHD6; considerando la posible influencia de las modificaciones adyacentes.

En la **figura R21** (*sup.*), se observa que los residuos modificados más importantes en la unión a los cromodominios son en la histona H4 las lisinas acetiladas 12, 16 y 20, siendo la acetilación en K16, la que presenta el mayor grado de interacción específica. Por otro lado, mientras que los residuos K12 y K16 sólo pueden estar acetilados, K20 puede estar tanto acetilada como metilada. En este sentido vemos que la acetilación en K20 es la que mejor se une específicamente a los cromodominios de CHD6.

Respecto a las modificaciones presentes en la histona H2B, que se muestran en la **figura R21** (*med.*), se observa que tanto la acetilación en K12 como en K15, interaccionan específicamente y en igual magnitud, no obstante, la acetilación en K5 también parece interaccionar aunque en menor escala.



**Figura R21. Los cromodominios de CHD6 se unen específicamente a modificaciones en residuos de H4 y H2B.**

Los 384 valores relativos de interacción provenientes del *array* de los His-cromodominios, fueron usados para determinar el cociente de interacción específica mediante el *software* del fabricante. Dicho cociente (para una modificación particular) proviene de la señal media de los péptidos que contienen dicha modificación y cuyos valores se encuentra por encima de umbral determinado arbitrariamente, entre la señal media de los péptidos que contiene la marca y cuyos valores se encuentran por debajo del umbral. Por tanto, este cociente considera la influencia de las modificaciones adyacentes y permite distinguir individualmente las modificaciones que interaccionan con los cromodominios de CHD6.

### 1.2.4 Los cromodominios de CHD6 se unen a metilaciones en R19 y K20 de H4

Respecto a las metilaciones analizadas que interaccionan específicamente con los cromodominios, **figura R21** (*sup.*), vemos que el grado de interacción específica del residuo K20 de la histona H4 es dependiente del grado de metilación, siendo la dimetilación (H4K20me2) la que presenta una unión mayor. Además de estas metilaciones en H4K20, también se observa que las dimetilaciones en los residuos adyacentes R19 y R17 también son capaces de unir los His-cromodominios, no obstante el grado de interacción específica es menor a la observada para H4K20me2.

Por otro lado, en la **figura R21** (*inf.*) se muestran las modificaciones de la histona H3 que interaccionan con los cromodominios de CHD6, observándose que la trimetilación en K27 y la citrulinación en R26, interaccionan aunque con baja especificidad (en comparación con las modificaciones en H4 y H2B). Respecto al papel biológico de estas dos modificaciones, H3K27me3 y H3R26cit, se sabe que la primera constituye una marca canónica de represión transcripcional, mientras que la segunda ha sido involucrada con la descondensación de la cromatina y la activación transcripcional de genes diana del receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), mediada por ER $\alpha$  y el coactivador PAD2 (*Peptidyl-Arginine Deiminase 2*) tras la inducción con 17- $\beta$ -estradiol (Xuesen 2012; Guertin 2014).

H4	K12ac	K16ac	K12ac +K16ac	R17me2s	R17me2a	R19me2s	R19me2a	K20me1	K20me2	K20me3	K20ac	R23me2a	R23me2s
mod. Ind.	0.07	0.20	0.20	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.15	0.07	0.43	0.03	0.04
+K12ac		0.20											
+K16ac	0.20			0.20	0.21	0.08	0.40	0.13	0.74	0.28	0.78		
+K12ac+K16ac								0.55	0.50	0.57	0.90		
+R17me2s		0.20											
+R17me2a		0.21											
+R19me2s		0.08						0.11	0.09	0.04	0.16		
+R19me2a		0.40						0.04	0.15	0.03	0.40		
+K20me1		0.13	0.55			0.11	0.04					0.03	0.03
+K20me2		0.74	0.50			0.09	0.15					0.06	0.03
+K20me3		0.28	0.57			0.04	0.03					0.02	0.03
+K20ac		0.78	0.90			0.16	0.40					0.06	0.07
+R23me2a								0.03	0.06	0.02	0.06		
+R23me2s								0.03	0.03	0.03	0.07		

H2B	K5ac	K12ac	K5ac +K12ac	K15ac
mod. Ind.	0.02	0.03	0.03	0.04
+K5ac		0.03		0.04
+K5ac+K12ac				0.71
+K12ac	0.03			1.00
+K15ac	0.04	1.00	0.71	

**Figura R22. Modificaciones adyacentes en H4 y H2B cooperan sinérgicamente en la unión a los cromodominios de CHD6.**

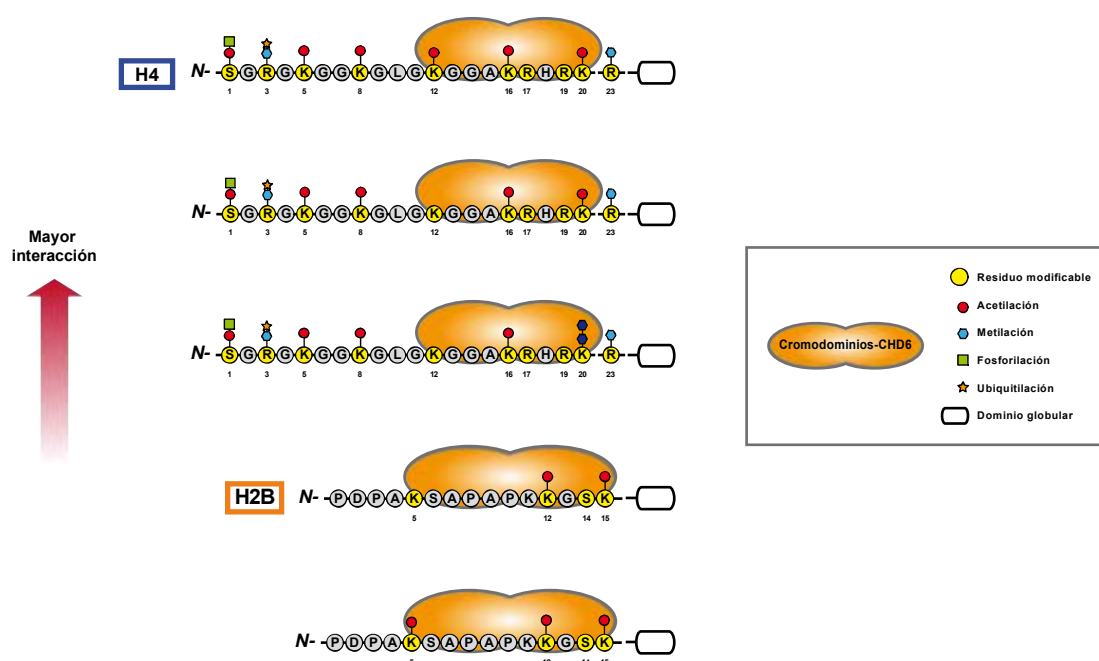
Tabla que muestra los valores relativos de interacción, provenientes del *array* entre los His-cromodominios y una selección de modificaciones individuales y combinatorias en H4 y H2B, en residuos relevantes en la unión a los cromodominios. Para distinguir y facilitar visualmente el efecto entre las modificaciones adyacentes se muestran en diferentes tonalidades de azul, los valores relativos de interacción que se encuentran por encima del umbral, mientras que las tonalidades en rojo representan los valores que se encuentran por debajo del umbral. En color gris se indican aquellas combinaciones que no se encuentran en el *array*.

### ***1.2.5 Combinación de modificaciones adyacentes en las histonas H4 y H2B cooperan sinérgicamente en su unión a los cromodominios de CHD6***

Dada la hipótesis del código de histonas y con ello las múltiples combinaciones de residuos modificados que pueden coexistir, es de vital importancia revelar las posibles interacciones entre los dominios “lectores” de los remodeladores de cromatina y las posibles secuencias combinatorias de las colas N-terminal de las histonas, lo que hemos abordado haciendo uso del *array* de péptidos modificados.

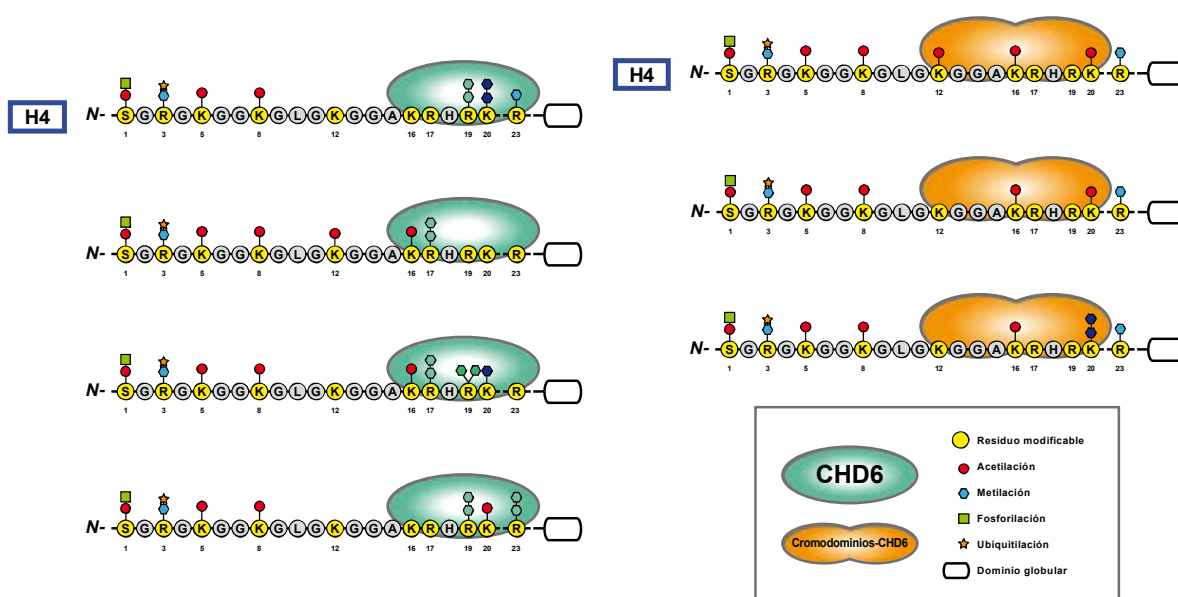
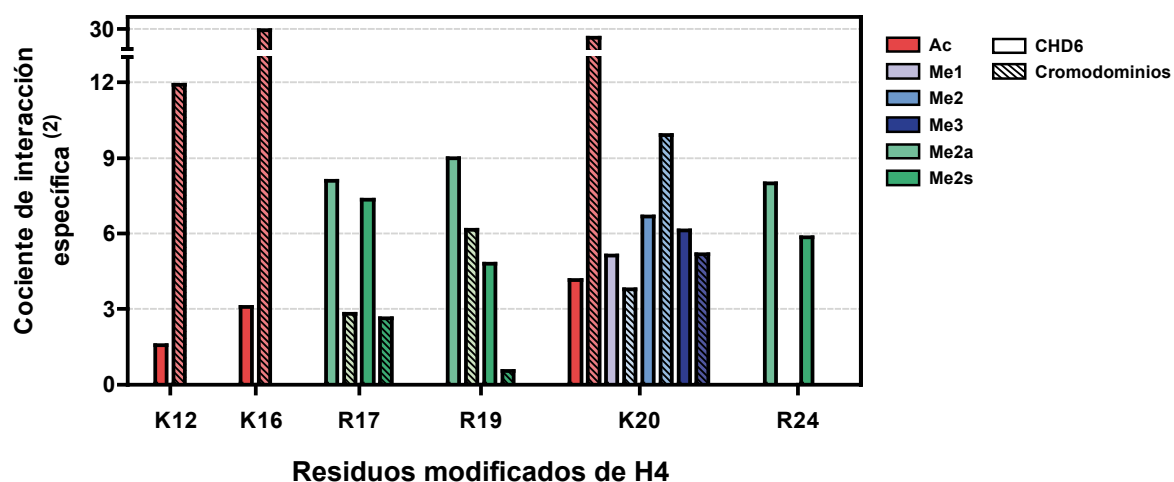
En la **figura R22** se muestra un mapa de colores, para las histonas H4 y H2B, que representa las intensidades de interacción relativa para una selección de modificaciones individuales y el efecto que tiene en su interacción cuando se añaden modificaciones adyacentes (dicha selección se hizo tomando en cuenta aquellas modificaciones individuales relevantes en su interacción específica con los cromodominios). En la figura se observa que, para el caso de las modificaciones de la histona H4: 1) el valor más alto de interacción con los cromodominios se obtiene cuando coexisten las tres marcas de acetilación H4K12ac+K16ac+K20ac seguida por la doble marca H4K16ac+K20ac; estos datos contrastan con los valores de interacción de las modificaciones individuales, puesto que con excepción de la acetilación en K20, K12ac y K16ac no parecen interaccionar con los cromodominios de CHD6. 2) el tercer valor más alto de intensidad, se observa cuando coexiste la doble modificación H4K16ac+K20me2, no obstante también se observan valores de interacción altos con la mono- y tri-metilación de K20. Por otra parte, en el caso de la histona H2B, solamente cuando se tiene la doble modificación H2BK12ac+K15ac se observa que interacciona con los cromodominios. En este caso la acetilación en K5 disminuye ligeramente la interacción, no obstante la triple acetilación H2BK5ac+K12ac+K15ac también interacciona con los-cromodominios de CHD6.

En la **figura R23** se presenta un esquema resumen de las modificaciones combinatorias en las histonas H4 y H2B que unen los cromodominios de CHD6.



**Figura R23. Los cromodominios de CHD6 interaccionan con modificaciones combinatorias de H4 y H2B.**

De forma resumida y de acuerdo a los análisis tanto de interacción específica como modificaciones adyacentes, se muestran solamente las modificaciones combinatorias en las histonas H4 y H2B que interaccionan con los cromodominios de CHD6 con un valor relativo >0.7; las cuales se encuentran ordenadas de mayor a menor interacción.



**Figura R24. La interacción entre HA-CHD6 y las modificaciones K16ac/K20me2 de H4 se encuentra gobernada por sus cromodominios.**

Para lograr identificar aquellas modificaciones comunes que interaccionan tanto con HA-CHD6 como con sus cromodominios se muestran solamente las modificaciones combinatorias en la histona H4 que interaccionan con un valor relativo >0.7; las cuales se encuentran ordenadas de mayor a menor interacción.





## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

La cromatina es una estructura dinámica en la que está contenida la información genética y que necesita alterar su disposición espacial para satisfacer las demandas cambiantes de las funciones celulares. Entre los factores reguladores que controlan la arquitectura de la cromatina, los remodeladores de cromatina ATP-dependientes, juegan un papel fundamental, ya que actúan controlando el acceso a la información genómica y son esenciales para la regulación transcripcional, la replicación del DNA, la reparación del DNA y la división celular. Los remodeladores de cromatina ATP-dependientes comparten la capacidad de utilizar la energía derivada de la hidrólisis del ATP para cambiar la estructura de los nucleosomas, abriendo o cerrando la cromatina para regular el acceso de factores de transcripción y RNA polimerasas a genes específicos.

Los remodeladores de cromatina de la familia CHD utilizan distintos mecanismos de reclutamiento para conseguir la regulación de genes específicos. *In vitro* no presentan especificidad de unión a secuencias determinadas, mientras que *in vivo* muestran una alta especificidad; requerida para modular con precisión la expresión genética, atendiendo a los distintos estímulos intra e intercelulares. Entre los mecanismos utilizados para ser reclutados a genes específicos, se han descrito la unión a factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en los promotores de los genes, la unión a modificaciones post-traduccionales en las histonas que componen los nucleosomas, así como la unión a DNA metilado. El resultado final e interconectado de estos mecanismos es el que asegura la activación o represión de genes específicos dentro de la cromatina.

Se han descrito algunos de estos mecanismos para miembros de la familia CHD. En el caso de CHD1, el complejo Mediator que controla los complejos de preiniciación de la transcripción (PIC), es requerido para el reclutamiento de CHD1 a la cromatina. Por otro lado, CHD1 se une a H3K4me3 tanto *in vitro*, como *in vivo* cerca del inicio de los genes activos (REF), lo que apoya un modelo combinado de acción del PIC y H3K4me3 para reclutar CHD1 a genes activos de una manera específica. CHD3/CHD4 son reclutados a genes específicos mediante el complejo NuRD de represión transcripcional, acoplado a la remodelación de nucleosomas con la histona deacetilasa catalizada por HDAC1/2. Además algunos complejos NuRD contienen subunidades que unen CpG lo que liga el complejo ensamblado a DNA metilado *in vitro*, sugiriendo que el reclutamiento de NuRD a promotores metilados contribuye a su actividad represora de la transcripción. CHD8, fue aislado originalmente como un regulador negativo de la vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina que se une directamente a  $\beta$ -catenina y suprime su actividad transactivadora. CHD8 promueve la

asociación de  $\beta$ -catenina y la histona H1 y el reclutamiento de H1 es esencial para el efecto inhibitorio de CHD8

CHD6 es un miembro muy poco caracterizado de la familia CHD, parece relacionado con algunos tipos de tumores como el de vejiga (Gui et al., 2011) y también con desordenes neuronales y retraso mental (Fliers et al., 2012, Yamada et al., 2010, Kalscheuer et al., 2008). Nada se sabe de su mecanismo de acción, de los genes regulados por este remodelador, ni de los mecanismos utilizados para su reclutamiento a genes específicos y ello ha constituido el objetivo fundamental de nuestro trabajo. Para su realización hemos desarrollado un análisis transcriptómico de genes regulados por CHD6, caracterizando las secuencias específicas reconocidas por factores de transcripción que se encuentran mayoritariamente en los genes regulados y la presencia de factores de transcripción entre ellos. Hemos caracterizado las modificaciones post-traduccionales de las histonas que son reconocidas tanto por la proteína endógena como por sus cromodominios aislados y su función como regulador de la proliferación celular. El conjunto de estos mecanismos y su interrelación deberían de ser los responsables de su función como regulador de ciclo celular, así como de otras posibles funciones de CHD6 no caracterizadas hasta el momento.

### **I. GENES MODULADOS POR CHD6 COMO POSIBLES REGULADORES DE SU FUNCIÓN DE ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

El análisis transcriptómico de CHD6 mostró que regula un número reducido de genes (291 *up/down*-regulados) que representan aproximadamente el 1% del total de los transcritos humanos, equitativamente distribuidos entre *up*- y *down*-regulados. El análisis ontológico, mostró que la lista de los genes *up*-regulados por CHD6 está enriquecida primordialmente en genes involucrados en procesos como la transducción de señales, regulación negativa de la transcripción, regulación negativa de la proliferación celular y regulación positiva de procesos apoptóticos; mientras que la lista de los genes *down*-regulados está enriquecida en genes involucrados en la modificación de la cromatina.

El enriquecimiento encontrado en anotaciones biológicas relacionadas con proliferación celular, junto con los datos previos de la abundancia de mutaciones en CHD6 en diversos tumores, nos estimuló a analizar su función en la división celular y su posterior identificación de factor regulador de la progresión de la fase S del ciclo celular. Varios de los genes modulados por CHD6 tanto *up*- como *down*-regulados, podrían contribuir al efecto observado en proliferación.

### I.1 Genes *up*-regulados

Sabemos que dentro de los genes *up*-regulados, FRK, INPP5D, ITGB1, LEPREL1, RERG, TNFRSF9 y VDR se encuentran asociados a la regulación negativa de la proliferación. La sobreexpresión de FRK, induce una parada en la fase G1 y una reducción en la proliferación, la expresión de INPP5 en células CD34(+) derivadas de pacientes con leucemia amieloide aguda produce una reducción en la proliferación mediada por la inactivación de la ruta de (PI3K)/AKT (Metzner et al., 2009), ITGB1 se ha descrito como un gen supresor de tumores, y niveles bajos están asociados con un incremento en la letalidad de cáncer de próstata (Broustas and Lieberman, 2014). Por otro lado la expresión de LEPRL se encuentra normalmente silenciada en cáncer de seno, y su expresión ectópica en células silenciadas conlleva a una reducción en la proliferación celular (REF) y RERG es un inhibidor del crecimiento celular, validado como biomarcador pronóstico de cáncer de seno de subtipo luminal, (Habashy et al., 2011, Wang et al., 2006a). El factor TNFRSF9 se ha descrito como un inductor pro-apoptótico que activa la vía NF- $\kappa$ B posterior a la parada en fase G1 del ciclo celular y por último VDR codifica un receptor nuclear de vitamina D, que en células epiteliales no malignas de próstata induce una parada del ciclo celular vía CDKN1A (gen que codifica p21), induciendo modificaciones de histonas en el promotor de CDKN1A; estos eventos epigenéticos permiten que VDR actúe sobre p53 para potenciar la activación de p21 (Thorne et al., 2011).

Por tanto en conjunto la mayoría de los genes *up*-regulados que están involucrados en la regulación negativa de la proliferación, concuerdan tanto con el enriquecimiento de dicha anotación, como con la disminución observada de proliferación en células silenciadas de CHD6.

#### ***GDF15 y NEDD4 como reguladores de la proliferación***

Ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina mostraron la interacción directa de CHD6 con dos genes de los más sobreexpresados en condiciones de silenciamiento de CHD6 (figura X), GDF15 y NEDD4. GDF15 es un miembro distante de la superfamilia TGF $\beta$  su expresión no ha sido detectada en ninguna (Li et al., 2000). GDF15 ha sido identificado como un gen antitumorigénico y pro-apoptótico y se le ha implicado en una variedad de funciones directamente relacionadas con la aparición de tumores, incluyendo efectos antiproliferativos. Su sobreexpresión disminuye la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata (Lambert et al., 2006), células de cáncer pancreáticos (Golkar et al., 2007), o células A549 de adenocarcinoma epitelial humanos (Chen et al., 2007). Además la sobreexpresión de GDF15 utilizando vectores virales produce una reducción importante en la viabilidad de varias líneas celulares tumorales, induciendo parada en la fase G1 del

ciclo celular (Li et al., 2000). El promotor de GDF15, es activado por el supresor de tumores p53 ya que contiene dos sitios de unión de p53 y se ha sugerido que GDF15 puede ser un mediador intracelular importante de la función de p53 (Li et al., 2000).

El sistema de ubiquitina-proteasoma es el mecanismo más importante involucrado en la degradación selectiva de proteínas. La ubiquitinación implica la conjugación de la ubiquitina a la proteína sustrato vía tres clases de enzimas: el enzima activador de la ubiquitina E1, el enzima encargado de la conjugación E2 y el enzima responsable de la ligación ubiquitina-proteína E3. NEDD4 es la ubiquitin ligasa E3 que tiene un papel fundamental en la degradación de Spy1A, una proteína ciclina-*like* requerida para la progresión a través de la fase G1/S del ciclo celular y por tanto esencial para la proliferación (Al Sorkhy et al., 2009). De acuerdo con ello niveles elevados de Spy1A han sido implicados en la formación de tumores mediado por un incremento en proliferación (Al Sorkhy et al., 2009). Por otro lado estudios transcriptómicos han mostrado que NEDD4 es el gen más activado en condiciones de *down*-regulación de la histona deacetilasa SIRT2, que muestra una gran preferencia por H4K16 acetilada (Liu et al., 2013). Inhibidores de SIRT2 reactivan la expresión de NEDD4, reducen la expresión de N-Myc y c-Myc y suprimen la proliferación de células tumorales de neuroblastoma y páncreas, poniendo de manifiesto el papel de NEDD4 en el control de la proliferación celular.

Conjuntamente GDF15 y NEDD4 contribuirían significativamente a la reducción de proliferación encontrada en condiciones de silenciamiento de CHD6, tanto por su función descrita en el control de la división celular, como en el hecho de su interacción directa con CHD6. Esta interacción estaría reducida en condiciones de silenciamiento, produciéndose una sobreexpresión de estos dos genes, con el consiguiente efecto en disminución de proliferación.

### ***Factores de transcripción involucrados en el control de la proliferación***

Un número de factores de transcripción involucrados en la regulación negativa de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (MDM2, VDR, SREBF1, ID1, ID2), la regulación negativa de la proliferación (VDR), cáncer (MDM2), regulación positiva de procesos apoptóticos (DDIT3) o vías de señalización de p53 (MDM2) resultaron sobreexpresados en condiciones de silenciamiento. Entre ellos discutiremos el posible papel de MDM2 y DDIT3, ya que su función en el control de la división celular ha sido extensamente caracterizada.

El gen MDM2 codifica una ubiquitin ligasa E3, que funciona como el principal antagonista del gen supresor de tumores p53, promoviendo su ubiquitinación y degradación

(8-10), esta actividad es considerada como la función biológica primaria de MDM2 tanto en células normales como cancerígenas. Además MDM2 interacciona con otros reguladores del crecimiento o ciclo celular, entre los que se encuentra p21. Mientras que la sobreexpresión de MDM2 en células malignas, se correlaciona con un incremento en la proliferación, se ha descrito un efecto diferente en células no tumorales. Así, la sobreexpresión transitoria a partir de su cDNA en células no tumorales conlleva a una parada en la fase G1 (Deb et al., 2014) y por otro lado su sobreexpresión dirigida a glándulas mamarias de ratón, provoca una inhibición en el desarrollo de la glándula mamaria y una falta de división celular (Lundgren et al., 1997). No obstante, a pesar de tal inhibición, las células epiteliales son activas en la incorporación del análogo de nucleótido BrdU, lo que sugiere una acumulación en de células en la fase S.

El gen DDIT3 también llamado GADD153 o CHOP, codifica un factor de transcripción de tipo cremallera de leucina, que es conocido como un regulador de la respuesta celular a estrés. Se ha descrito, que la sobreexpresión y microinyección de la proteína DDIT3 conduce a parada en el ciclo celular y/o apoptosis (Matsumoto et al., 1996, Maytin et al., 2001, Barone et al., 1994, Oyadomari et al., 2001, Gotoh et al., 2002) y ratones deficientes muestran una disminución de apoptosis en respuesta a estrés de retículo endoplásmico (Oyadomari et al., 2001, Zinszner et al., 1998, Oyadomari et al., 2002) indicando que DDIT3 juega un papel importante en la apoptosis inducida por estrés de retículo endoplásmico.

En conjunto, existe un número importante de genes cuya expresión aumenta en condiciones que reducen la expresión de CHD6, que podrían estar implicados en la disminución de la división celular encontrada en estas condiciones. Hay que resaltar el papel de GDF15 y NEDD4, ya que CHD6 interacciona directamente con el promotor de estos dos genes, particularmente muy activamente con el promotor de NEDD4, modulando la iniciación de su transcripción.

## **I.2 Genes *down-regulados***

Entre los genes cuya expresión disminuye en células silenciadas de CHD6, la única anotación biológica enriquecida es la de modificación de la cromatina. Entre estos genes encontramos AEBP2, ARID2, HDAC4, RNF168, SUDS3 y SUZ12. Puesto que en otros miembros de la familia CHD se ha visto su interacción con complejos remodeladores de cromatina, como es el caso de CHD3 y CHD4 con el complejo represor NuRD, es posible que estas proteínas además de ser dianas de regulación por CHD6 puedan formar complejos con los que interacciones CHD6.

En general los remodeladores de cromatina cuya expresión se encuentra disminuida en células con baja expresión de CHD6, forman parte de complejos represores de actividad transcripcional implicados en la regulación del ciclo celular. Tal es el caso de AEBP2 que interacciona con el complejo de represión PRC2 (*Polycomb Repression Complex 2*), o HDAC4 que codifica una deacetilasa de histona, que induce un estado de condensación de la cromatina y con ello la represión transcripcional. HDAC4 participa en la represión del promotor del gen p21 a través de sitios Sp1/Sp3 y no p53, por lo que la inducción de p21 mediada por el silenciamiento de HDAC4, para el crecimiento de células cancerígenas *in vitro*, e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en modelo de glioblastoma humano (Mottet et al., 2009). SDS3 se ha descrito como una proteína adaptadora que recluta el complejo represor Sin3 (*Switch-independent 3/HDAC*) y regula la progresión del ciclo celular de progenitores miogénicos reprimiendo al gen inhibidor del ciclo celular p21. SUZ12 pertenece al grupo PcG (*Polycomb Group*) formando diferentes complejos represivos (PRC2/3) con actividad metiltransferasa de H3K27/9 e H1K26. Ratones deficientes de SUZ12 no son viables y mueren en etapa tempranas post-implantación, mostrando un acusado defecto proliferativo y una pérdida en la di- y trimetilación de H3K27.

Estos datos en conjunto nos dicen que cuando se silencia CHD6, existe una *down*-regulación de genes que codifican proteínas remodeladores de cromatina, que forman parte de complejos represores transcripcionales (Sin3 o PRC2/3), que compactan la estructura de la cromatina por medio de las actividades modificadoras de algunas de sus subunidades (HDAC). Esta disminución de represión transcripcional aumenta la expresión principalmente de genes implicados en la regulación negativa del ciclo celular, por lo que la *down*-regulación de estos remodeladores está asociada a una disminución en el crecimiento celular.

## II. FUNCIÓN DE REMODELADORES DE CROMATINA EN PROLIFERACIÓN CELULAR

Según se describió en la introducción, los remodeladores de cromatina se clasifican en cuatro familias diferentes, atendiendo a la disposición de sus dominios: SWI/SNF, ISWI, CHD and INO80. Además del efecto de CHD6 en el control de la proliferación celular, miembros de estas familias han mostrado ser críticos para la diferenciación y proliferación celular. Pérdida de función de SWI/SNF se ha asociado con malignidad y existen evidencias de que varios componentes de los complejos SWI/SNF funcionan como supresores de tumores (Reisman et al., 2009). BRG1, la subunidad catalítica de los complejos SWI/SNF, tiene un papel fundamental en proliferación ya que up-regula el transcriptoma de células B durante su activación promoviendo una rápida proliferación celular y activar una respuesta inmune efectiva (Holley et al., 2013). Por otro lado, Snf2h, el análogo murino de ISWI también participa en la proliferación celular, y ha sido postulado que Snf2h está involucrado



en la modulación del ciclo celular afectando la transición G1-S (Falbo and Shen, 2006). De acuerdo con ello Snf2h interacciona dentro de un complejo proteico con PCNA (un factor clave en la replicación de DNA), induciendo la replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular (Poot et al., 2005).

### III. MECANISMOS DE RECLUTAMIENTO DE CHD6 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS

Como se ha mencionado, la acción conjunta de unión de los remodeladores de cromatina a factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en promotores y el reconocimiento de modificaciones específicas en las histonas por estos remodeladores, constituye el mecanismo conjunto que provee de especificidad a los remodeladores de cromatina, para activar o inhibir a determinados genes específicos. Los análisis realizados en este trabajo, permiten discutir ambos aspectos.

#### III.1 Dominios reconocidos por familias de factores de transcripción en los genes regulados por CHD6

Según se presentó en la figura 5, los promotores de los genes regulados por CHD6, contienen secuencias específicas que son reconocidas por familias de factores de transcripción, entre las que destacan las familias EGR y E2F que además se encuentran tanto en los promotores de los genes *up*- como *down*-regulados por el silenciamiento de CHD6

##### **Familia EGR**

Los factores de transcripción EGR constituyen una familia de cinco proteínas que incluyen EGR1-EGR4 y WT1, las cuales tienen una homología del 90% en su dominio de unión al DNA, formado por dedos de zinc de tipo Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, lo que les proporciona la capacidad de unirse a una secuencia común rica en GC. Para EGR1, el prototipo de la familia EGR, se ha descrito su inducción por una diversidad de estímulos, incluyendo factores mitógenos (Gashler and Sukhatme, 1995), siendo algunos de estos estímulos comunes para la inducción de EGR3 (O'Donovan et al., 1998, Mercier et al., 2001, Jouvvert et al., 2002) y está involucrado tanto en proliferación como diferenciación en una amplia variedad de tejidos y líneas celulares. EGR2 está asociado a autoinmunidad sistémica vía desregulación de la proliferación de las células T y producción de citoquinas [Revisado en (Sumitomo et al., 2013)]. Por otro lado, tanto EGR2 como EGR3 inhiben la secreción de interferón (INF)-γ así como de IL2 por las células T. EGR4 actúa como un represor transcripcional, y su sobreexpresión controla la represión del promotor mínimo c-fos por medio del triple motivo

consenso EGR. Por último WT1 se encuentra mutado en un pequeño grupo de pacientes con tumores Wilm y posee una actividad oncogénica y supresora de tumores, sin embargo las causas que subyacen a estas funciones antagónicas, no están del todo claras. Como regulador transcripcional, WT1 puede tanto activar como reprimir numerosos genes diana, resultando en efectos biológicos dispares como crecimiento y apoptosis. Existe también evidencia que el mRNA de WT1 es regulado durante el desarrollo, tanto en humano y rata.

Hay que destacar que los promotores de GDF15, NEDD4 y HPRT, contienen secuencias reconocidas por EGR1 y Wilm (tabla sX) y por tanto estos factores de transcripción podrían tener una función en el reclutamiento de CHD6 a los promotores de estos genes, de acuerdo a lo presentado en la figura Y.

### ***Familia E2F***

Los factores transcripcionales E2F controlan la expresión de numerosos genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular, inicio de la síntesis del DNA y mitosis. Básicamente, los factores de la familia E2F en mamíferos son codificados a partir de 8 genes y pueden dividirse en dos grupos en base a estudios funcionales y análisis de secuencia: E2F activadores (E2F1, E2F2 y E2F3a) y E2F represores (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7a, E2F7b y E2F8) (Chen et al., 2009). La mayoría de los miembros de la familia E2F (E2F1-E2F6) requieren una heterodimerización con miembros de las proteínas DP (DP1-3) para unirse al DNA en los promotores de sus genes diana (Chen et al., 2009). E2Fs activadores y represores actúan a lo largo del ciclo celular para promover la expresión de sus genes diana en el momento preciso que se inicia la transición G1/S, con un pico en la fase S que decae hasta la fase G2 (Chen et al., 2009). Los E2F activadores son necesarios para la transcripción de los genes implicados en la transición G1/S y para la correcta progresión a través del ciclo celular (Bracken et al., 2004). Son fuertes activadores transcripcionales a los que preferencialmente se une pRb para inhibir la transcripción de sus genes diana. Generalmente, en células quiescentes no hay expresión de E2F activadores o es muy baja, sin embargo, en G1 tardía su expresión se induce a un alto nivel. Así la pérdida de los tres miembros E2F activadores provoca la entrada de la proliferación (Wu et al., 2001). La sobreexpresión de una de estas proteínas en células quiescentes es suficiente para promover la entrada en fase S (Johnson et al., 1993).

E2F6-8 poseen características distintas a los otros miembros de la familia E2F, dado que reprimen la transcripción de manera independiente a los otros miembros de la familia. Se ha demostrado que E2F6 inhibe la transcripción de los genes diana de los E2F a través de su asociación con las proteínas del grupo *Polycomb* (PcG) (Cobrinik, 2005, Ogawa et al., 2002). E2F7 y E2F8 muestran un mayor grado de expresión durante la fase S media-tardía y

podrían estar regulando genes diana de E2F a lo largo del ciclo, así como también se han implicado en la represión del promotor de E2F1 (Li et al., 2008).

De una manera análoga a CHD6, CHD8 se une a un gran número de promotores activos que contienen secuencias reconocidas por la familia de factores de transcripción E2F y también al igual que CHD6 es requerida para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Subtil-Rodriguez et al., 2014). CHD8 interacciona con E2F1 y por otra parte el reclutamiento de E2F1 y E2F3 en la fase S, requiere la presencia de CHD8. De los tres promotores de genes identificados que interaccionan con CHD6; GDF15, NEDD4 y HPRT, hemos comprobado que los tres contienen secuencias de reconocimiento para E2F1, E2F2, E2F3 y E2F6, siendo el promotor de NEDD4 el que posee una mayor abundancia de secuencias de reconocimiento para esta familia de factores de transcripción, especialmente para E2F2 y E2F3 (tabla sX). Estos resultados sugieren que CHD6 y CHD8, podrían compartir mecanismos comunes de control de la proliferación regulando la transición de G0/G1 a la fase S, un proceso altamente controlado y crítico para una diferenciación adecuada y que está desregulada en la mayoría de los cánceres.

Además de las secuencias reconocidas en los promotores de los genes cuya expresión se regula por CHD6, por familias de factores de transcripción conocidas, la búsqueda identificó un motivo de 12 nucleótidos presente mayoritaria y exclusivamente en los genes cuya expresión disminuye en condiciones de baja expresión de CHD6 y que no ha sido previamente descrito como reconocido por factores de transcripción. Esta secuencia se identificó utilizando criterios muy estrictos y debería representar un mecanismo específico de reclutamiento de CHD6 a los genes que *down*-regula, mediado por factores no identificados hasta el momento. Dado que los genes que se *down*-regulan están implicados mayoritariamente en regulación de la cromatina, sería muy interesante estudiar si constituye un motivo común entre los promotores de los genes regulados por los remodeladores de cromatina y más específicamente por la familia CHD.

### **III.2 Modificaciones post-traduccionales reconocidas por CHD6**

La cromatina es sensible a constantes remodelaciones, a través de la compactación y descompactación del DNA, mediada por el ensamblaje y desensamblaje de las histonas, las cuales contienen un gran número de modificaciones post-traduccionales. El cromodominio ha sido propuesto como un módulo que media la interacción con determinadas modificaciones de histonas de una gran variedad de complejos proteicos, reclutando estos complejos a genes conteniendo modificaciones específicas y regulando una plétora de procesos celulares. No obstante, análisis funcionales de un gran número de distintos

cromodominios, revelan sorprendentemente una amplia diversidad de dianas de interacción, que además de histonas, incluyen secuencias de DNA y moléculas de RNA (Brehm et al., 2004). El cromodominio constituye un dominio altamente conservado entre plantas y animales, estructuralmente está relacionado con los módulos MBT, PWWP, Tudor y TTD los cuales conforman la familia real (*Royal family*) siendo el cromodominio el miembro más pequeño. Los análisis convencionales de reconocimiento de PTMs por los dominios lectores de los remodeladores de cromatina se realizan utilizando ensayos de unión a péptidos (*pull-down*) con modificaciones predeterminadas, lo que no permite identificar la contribución de modificaciones múltiples presentes en la misma molécula de histona. Con este tipo de análisis se ha descrito que los módulos lectores de la familia real, unen lisinas metiladas de las histonas H3 y H4 [ver revisión (Musselman et al., 2012b)]. Únicamente en el caso del bromodominio (BRD) utilizando péptidos con modificaciones múltiples o combinatorias, se ha descrito que se une ávidamente a la di- y tetra-acetilación de la histona H4 y a la di-acetilación de la histona H3, y se une débilmente, o no se une, a la mono-acetilación y residuos no acetilados de H3 y H4, requiriendo esta interacción los dos bromodominios (Dey et al., 2003). Existe poca información de la interacción entre modificaciones de histonas y los cromodominios, y se ha descrito su interacción con los residuos metilados H3K4, H3K9 y H3K27 (Musselman et al., 2012a). Dentro de la familia CHD, los cromodominios de CHD1 y CHD8 interaccionan con residuos de lisina metilados, preferentemente H3K4me3 y H3K4me2, respectivamente (Flanagan et al., 2005, Rodríguez-Paredes et al., 2009) y los cromodominios de CHD7 parecen reconocer tanto marcas de cromatina activa como H3K4me3 (Schnetz et al., 2009), como inactiva H3K9me3 (Takada et al., 2007).

### ***Comparación de histonas modificadas reconocidas por CHD6 y sus cromodominios***

Las histonas pueden presentar muy distintas modificaciones, que incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. Se sabe que la actividad de un dominio lector hacia una modificación particular puede verse influenciada por PTMs vecinas, lo que genera unas posibilidades enormes de regulación y abre un abanico enorme de código epigenético. Las modificaciones más estudiadas en cuanto a su contribución al reclutamiento de remodeladores de cromatina, han sido las acetilaciones y metilaciones de las lisinas. El análisis de las PTMs individuales reconocidas por HA-CHD6 mostró su capacidad de unión tanto a residuos acetilados como metilados de las lisinas de las histonas H4 y H3. Entre los péptidos conteniendo residuos acetilados, hay que destacar la unión a K12, K16 y K20 de la H4 y a K36, K15 y K13 de la H3 (tabla 4). En general la acetilación de histonas se ha visto que se correlaciona con cromatina transcripcionalmente activa y está de acuerdo con la observación de disminución en la expresión de una serie de genes en condiciones de silenciamiento de CHD6. Respecto a las lisinas metiladas reconocidas por CHD6, hay que

destacar su unión a K20 di- mono- y trimetilada de H4 y en la H3 a K36 tri- y dimetilada y K27 mono- y trimetilada (Tabla 4), estando estas metilaciones en H3 identificadas como marcas de cromatina transcripcionalmente activa (H3K36me) e inactiva (H3K27me), respectivamente. Particularmente relevante parece ser la metilación en la H4K20, ya que la combinación de distintos grados de metilación de este residuo con distintas metilaciones en las argininas R19 y R24 de la H4, potencia la unión de CHD6 a H4K20 con metilaciones individuales y constituyen los péptidos que presentan mayor especificidad de unión. De igual manera hay que destacar que la combinación de H4K20me<sub>2</sub> con acetilación en la K16, potencia la unión de CHD6 observada a cada una de estas marcas individuales.

Estudios previos de nuestro laboratorio, mostraron que CHD6 se encuentra formando parte de complejos multiproteicos de gran tamaño alrededor de 2-3 megadaltons (Lutz et al., 2006). El análisis de reconocimiento de PTMs por HA-CHD6, se realizó a partir de HA-CHD6 inmunopurificada y posiblemente formando parte de sus complejos multiproteicos. Para analizar la posible contribución de reconocimiento de PTMs específicamente por CHD6, realizamos el mismo abordaje con el doble cromodominio de CHD6 expresado y purificado a partir de bacterias. Comparando los resultados obtenidos entre las PTMs reconocidas por HA-CHD6 y por los cromodominios, observamos, que estos al igual que HA-CHD6 reconocen lisinas acetiladas en H4 (K12, K16 y K20), pero en este caso, se requieren en general dobles o triples acetilaciones para su unión (tabla 5), reforzando la capacidad de CHD6 de unirse a marcas de acetilación que implican cromatina transcripcionalmente activa. En cuanto a metilaciones de lisinas, los cromodominios reconocen a H4K20 tri-, mono- y dimetilada, de manera similar a lo observado con CHD6, pero en este caso la contribución de modificaciones adyacentes es muy importante, de tal manera que solo cuando la H4K20 metilada se encuentra en el contexto de acetilaciones adyacentes, es reconocida eficazmente. Particularmente interesante es el reconocimiento de los cromodominios por H4K20me, ya que la presencia de acetilaciones adyacentes en H4K16, sin duda potencian la unión, y la combinación H4K16ac+H4K0me<sub>2</sub> es la PTM con lisinas metiladas, mejor reconocida, tanto por el cromodominio como por la proteína HA-CHD6. Esta doble marca podría constituir la modificación de histonas metiladas en lisinas reconocida por los complejos multiproteicos en los que se encuentra CHD6, dirigida específicamente por el cromodominio de CHD6.

La modificación H4K20me<sub>2</sub>, ha sido descrita como la modificación mejor reconocida por el dominio Tudor de 53BP1 (Kim et al., 2006), proteína de respuesta a daño a DNA que forma foci en dobles roturas de DNA, promoviendo su reparación. Utilizando un ensayo de array similar al utilizado en este trabajo, se ha observado que también en este caso una modificación secundaria en H4K16ac o H4K12ac, aumentan la unión a K20me<sub>2</sub>, siendo los

péptidos que llevan estas dobles marcas, la de mayor afinidad de unión (Musselman et al., 2012a).

La metilación en H4K20 ha sido involucrada en diferentes procesos celulares. H4K20me1 ha sido relacionada con represión transcripcional e inactivación del cromosoma X (Karachentsev et al., 2005, Kohlmaier et al., 2004) y H4K20me2 tiene una función importante en respuesta celular a daño de DNA de acuerdo a lo mencionado (Botuyan et al., 2006, Schotta et al., 2008). H4K20me3 se encuentra enriquecida en heterocromatina pericentromérica, se incrementa durante el envejecimiento (Sarg et al., 2002) y niveles reducidos de H4K20me3 se correlacionan con la progresión de cáncer (Fraga et al., 2005), constituyendo un marcador de diferentes cánceres humanos (Fraga et al., 2005, Tryndyak et al., 2006).

### **III.3 La metilación en H4K20 durante el ciclo celular**

La transición entre proliferación y quiescencia, se asocia frecuentemente con cambios en la expresión genética, la compactación de la cromatina y la modificación de histonas, pero qué cambios en la cromatina regulan este proceso, no está muy bien caracterizado. Como hemos mostrado, tanto HA-CHD6 como su doble cromodominio se unen a la lisina 20 de H4 mono-, di- y trimetilada y como hemos descrito CHD6 controla la proliferación, estando involucrada en la progresión de la fase S. Metilaciones en la H4K20, tienen un papel fundamental en las distintas fases del ciclo celular. De hecho la lisina 20 de H4 monometilada es un marcador muy bien caracterizado de la progresión de ciclo celular (Schotta et al., 2004). El análisis de las fases del ciclo celular ha mostrado que H4K20me1 aumenta después de la fase S para convertirse en H4K20me2 y me3 en células quiescentes. El silenciamiento de la metilasa que origina H3K20me3 produce un incremento en la fracción de células en fase S y la sobreexpresión de Suv4-20 que convierte H4K20me2 en H4K20me1 produce parada en fase G2, consistente con el papel de H4K2me1 en la mitosis.

En conjunto la regulación llevada a cabo por CHD6 sobre el ciclo celular y sobre otras posibles funciones no caracterizadas, vendría mediada por la modulación de genes que contienen en sus promotores secuencias específicas de reconocimiento para las familias EGR y E2F, y por el reconocimiento en sus genes dianas de modificaciones post-traduccionales de las histonas H4 y H3, fundamentalmente acetilaciones de lisinas y metilaciones en el residuo de lisina 20 de la histona H4 y también en la lisina 36 y 27 de la histona H3.

## CONCLUSIONES

1. El silenciamiento de CHD6 en células HEK293T, indica que CHD6 regula genes que estarían principalmente involucrados en la proliferación celular, apoptosis y regulación negativa de la transcripción.
2. El análisis bioinformático de los promotores de genes regulados por CHD6, muestra un enriquecimiento de motivos canónicos de unión a factores de transcripción de las familias E2F, EGR y SP1, sugiriendo que la regulación por CHD6 de sus genes diana estaría mediada por factores de transcripción pertenecientes a dichas familias.
3. Se ha caracterizado un motivo no descrito previamente presente en al menos el 65% de los genes *down*-regulados por CHD6. Indicando que este motivo podría tratarse o bien, de un nuevo motivo de unión a factores de transcripción o de un motivo de unión a CHD6.
4. Se ha identificado la interacción de CHD6 con los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1 mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, indicando que CHD6 se une tanto a las regiones promotoras como codificantes de estos genes, y sugiriendo que CHD6 estaría involucrada tanto en la iniciación de la transcripción como en la elongación.
5. El análisis de la regulación del gen de HPRT, agente causal de la enfermedad de Lesch-Nyhan, por CHD6 mostró que los exones 9, 30 y 31 de CHD6 están involucrados en su regulación, mientras que serían dispensables los exones 3, 33, 34 y 37. Estos datos sugieren la existencia de formas de *splicing* alternativo de CHD6 no identificadas que podrían modular la expresión de HPRT.
6. CHD6 regula la proliferación celular y concretamente la progresión de la fase S, según lo muestran los experimentos de FACS y pulso-caza de BrdU.
7. El análisis de unión a modificaciones de histonas por parte tanto de HA-CHD6 endógena como de sus cromodominios muestra que ambos se unen principalmente a modificaciones combinatorias de la histona H4, con mayor intensidad a la doble marca K16ac-K20me2. Dicha marca solo ha sido descrita en determinados tejidos, aunque su papel en la regulación de la transcripción no ha sido dilucidado.





## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

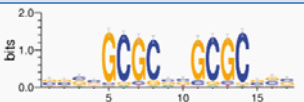

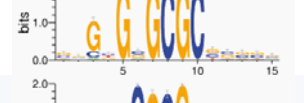
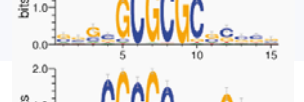
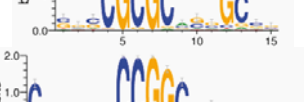
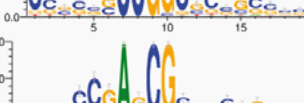
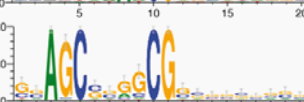
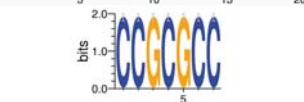
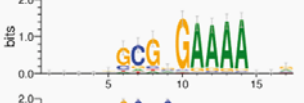
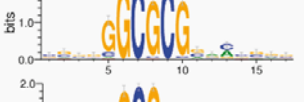
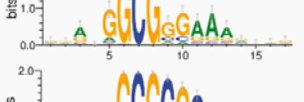
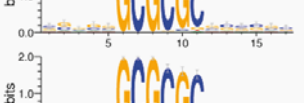
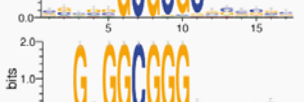
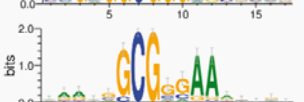
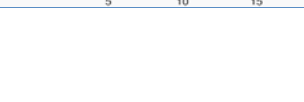



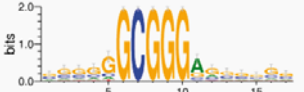
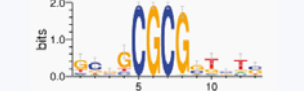
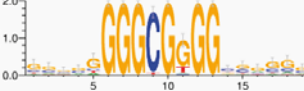
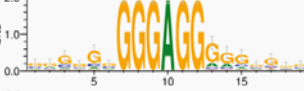
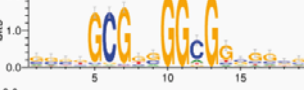
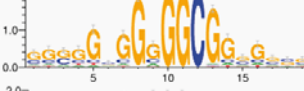


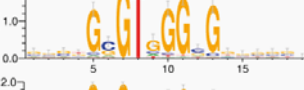
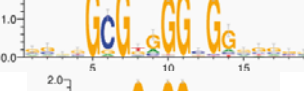
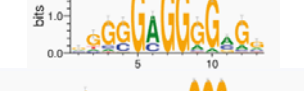
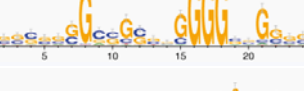
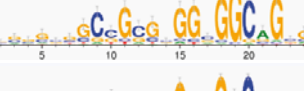
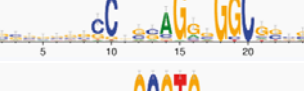
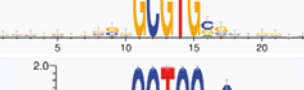
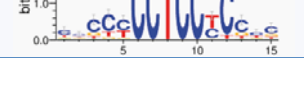
# MATERIAL SUPLEMENTARIO

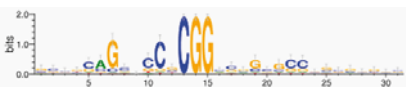
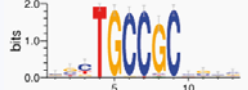
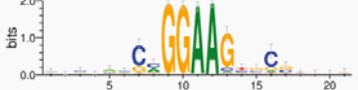
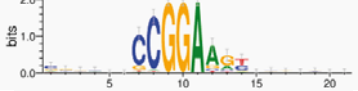
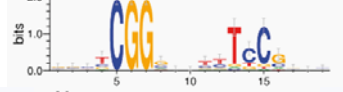
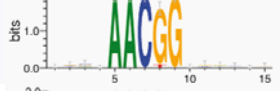
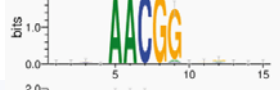

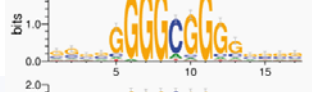
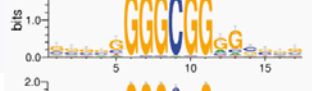
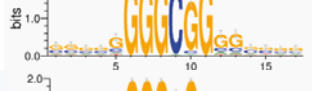
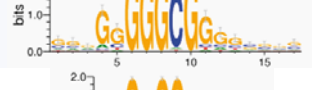

**Suplementaria RS1. Detalle de genes regulados que conforman las anotaciones GO enriquecidas de células silenciadas para CHD6.**

ON.	ANOTACION	DESCRIPCIÓN	B	N	B	N	P*	GENES
<b>Up-regulados</b>								
BP	GO:0007165	Signal transduction	16	121	1176	34208	1.4 e-3	ADM, ANXA1, ARHGAP24, DKK1, FAM13A, FAS, GDF15, INPP5D, OCRL, PLCB1, PRK AB2, RERG, TNN, TRAF3, TRAF6, VDR
BP	GO:0000122	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	9	121	416	34208	4.1 e-3	DKK1, EFNA1, ID1, ID2, MDM2, SREBF1, TRAF6, TXNIP, VDR
BP	GO:0008285	Negative regulation of cell proliferation	8	121	341	34208	4.2 e-3	ADM, FRK, INPP5D, ITGB1, LEPREL1, RERG, TNFRSF9, VDR
BP	GO:0043065	Positive regulation of apoptotic process	7	121	178	34208	2.4 e-3	ANXA1, CYR61, DDIT3, FAS, INPP5D, ITGB1, TXNIP
BP	GO:0006629	Lipid metabolic process	7	121	241	34208	4.3 e-3	ANXA1, APOC1, GPCPD1, NAAA, OCRL, PNPLA4, SREBF1
BP	GO:0042493	Response to drug	7	121	301	34208	8.7 e-3	ANXA1, DDIT3, FAS, ITGB1, SNCA, SREBF1, TXNIP
BP	GO:0007568	Aging	5	121	114	34208	5.4 e-3	ADM, DDIT3, FAS, SREBF1, VDR
BP	GO:0007160	Cell-matrix adhesion	4	121	75	34208	9.3 e-3	CD44, COL13A1, ITGB1, TNN
BP	GO:0031623	Receptor internalization	3	121	27	34208	9.0 e-3	ADM, NEDD4, SNCA
BP	GO:0042063	Gliogenesis	2	121	3	34208	4.2 e-3	ANXA1, PDGFRA
BP	GO:0032963	Collagen metabolic process	2	121	5	34208	8.4 e-3	ID1, LEPREL1
MF	GO:0005515	Protein binding	37	121	4463	34208	7.5 e-5	ADM, AKR1B10, ANXA1, ARHGAP24, ATPAF1, CD44, CDK14, COL13A1, DKK1, EFNA1, EMILIN2, ENPP1, FAS, FRK, FZD10, GAP43, ID1, ID2, INPP5D, ITGB1, MDM2, NANOS1, NEDD4, OCRL, PRKAB2, PROCR, RBS1, RCHY1, RELB, SNCA, SREBF1, SULT2A1, TRA2B, TRAF3, TRAF6, TXNIP, VDR
MF	GO:0046872	Metal ion binding	20	121	2879	34208	4.9 e-2	ENPP1, ISCA1, LEPREL1, MDM2, NANOS1, PTS, RCHY1, RFESD, RIMKL, SIRT5, SUMF1, TRAF3, TRAF6, TYW1, VDR, ZDHHC20, ZNF326, ZNF420, ZNF555, ZNF658
MF	GO:0005488	Binding	9	121	731	34208	4.8 e-2	CD44, FAS, ITGB1, LEPREL1, MRO, REG1A, SUMF1, THBD, TNFRSF9
MF	GO:0042803	Protein homodimerization activity	7	121	514	34208	4.9 e-2	ANXA1, ENPP1, PDGFRA, PLCB1, PTS, RCHY1, SUMF1
MF	GO:0042802	Identical protein binding	6	121	299	34208	3.6 e-2	AMOTL2, FAS, PRKAB2, PTS, SNCA, TNN
MF	GO:0016491	Oxidoreductase activity	6	121	437	34208	3.8 e-2	AKR1B10, ERO1L, HSD17B11, RFESD, SUMF1, TYW1
MF	GO:0005178	Integrin binding	4	121	76	34208	1.6 e-2	CYR61, ITGB1, MFGE8, TNN
CC	GO:0005737	Cytoplasm	43	121	5302	34208	3.2 e-6	ADM, AKR1B10, ANXA1, ARHGAP24, BEX2, CABLES1, CD44, CDK14, CELF2, DDIT3, FAS, FRK, FZD10, G3BP2, GPCPD1, HSD17B11, ID1, ID2, INPP5D, MDM2, NAAA, NANOS1, NEDD4, NEXN, NOTCH2NL, PANK3, PDGFRA, PERP, PLCB1, PRKAB2, PTS, RCHY1, RELB, RELL1, RERG, RIMKL, ROR1, SHROOM1, SNCA, SULT2A1, TRAF3, TRAF6, TXNIP
CC	GO:0005634	Nucleus	38	121	5441	34208	7.1 e-4	ANXA1, BEX2, CABLES1, CDC40, CDK14, CELF2, CENPN, DDIT3, FAS, FRK, FZD10, HIST1H2AC, ID1, ID2, ITGB1, MDM2, MFSDB, MRO, PANK3, PDGFRA, PERP, PLCB1, RBS1, RCHY1, RELB, RERG, SH3BGR2, SMC1B, SNCA, SREBF1, TCEAL7, TRA2B, TRAF6, TXNIP, VDR, ZNF326, ZNF420, ZNF555, ZNF658
CC	GO:0005829	Cytosol	26	121	2146	34208	3.6 e-6	ARHGAP24, CABLES1, CDK14, CENPN, FAS, FAM13A, FAS, G3BP2, GBE1, GBP1, GPCPD1, ID2, INPP5D, MDM2, NEDD4, OCRL, OSTM1, PLCB1, PRKAB2, RELB, RERG, SNCA, SULT2A1, TRAF3, TRAF6, TXNIP, VDR
CC	GO:0005886	Plasma membrane	26	121	3575	34208	9.1 e-3	ARHGAP24, CD44, CDK14, COL13A1, DKK1, EFNA1, ENPP1, FAS, FRK, FZD10, GAP43, GBP1, GPC6, HLA-D, INPP5D, ITGB1, MDM2, NEDD4, NPFR2, PDGFRA, PERP, RECK, RELL1, ROR1, SNCA, TRAF6
PW	Kegg:05200	Pathways in cancer	7	121	324	34208	8.0 e-3	FAS, ITGB1, MDM2, PDGFRA, TRAF3, TRAF6
PW	Kegg:04115	p53 signaling pathway	4	121	67	34208	9.5 e-3	FAS, MDM2, PERP, RCHY1
<b>Down-regulados</b>								
BP	GO:0016568	Chromatin modification	6	115	224	34208	4.2 e-2	AEBP2, ARID2, HDAC4, RNF168, SUDS3, SUZ12
MF	GO:0005515	Protein binding	42	115	4463	34208	2.6 e-8	A_32_P148199, APPBP2, ARID2, ATR, CDC42SE2, CDON, DYX1C1, ELK3, GEMIN2, GK, GSK3B, HDAC4, HNRNPF, HPRT1, ITM2C, MKI67, MPP1, MRAP1, MYCBP, NIN, PABPC4, PARD6G, PCBP1, POU2F1, PRUNE, PVRL3, RAB11FIP2, RAB11FIP4, RAB14, RAB3IP, RNF168, RUNX3, SNX4, SON, SPRED2, SUDS3, SUZ12, SYNJ2, TFG, TGOLN2, TOMM20, VPS4B
MF	GO:0000166	Nucleotide binding	22	115	2120	34208	1.8 e-4	AK4, ATR, CHD6, GK, GSK3B, HNRNPF, HPRT1, HSPA6, IARS2, MAP2K6, MKI67, NIN, PABPC4, PGK1, RAB14, RAB8B, RAVR1, RIMKL, SPATASL1, SYNJ2, TOR1B, VPS4B
MF	GO:0005524	ATP binding	16	115	1489	34208	2.3 e-3	AK4, ATR, CHD6, GK, GSK3B, HSPA6, IARS2, ITM2C, MAP2K6, MKI67, PGK1, RIMKL, RUNX3, SPATASL1, TOR1B, VPS4B
CC	GO:0005737	Cytoplasm	42	115	5302	34208	3.3 e-6	A_32_P148199, AB2, APPBP2, ARPP19, CDC42SE2, DCTN4, DYX1C1, GEMIN2, GK, GOLPH3L, GSK3B, HDAC4, HNRNPF, HPRT1, IARS2, MAP2K6, MKI67, MPRIP, MRAP1, MTPN, MYCBP, NIN, PABPC4, PAFAH1B2, PARD6G, PCBP1, PGK1, PRUNE, RAB3IP, RAVR1, RIMKL, RUNX3, SNX4, SPATASL1, SPRED2, SYNJ2, TFG, TOR1B, UTP15, VPS4B, WDR26, ZCCHC2
CC	GO:0005634	Nucleus	40	115	5441	34208	3.1 e-5	AEBP2, APPBP2, ARID2, ATR, CDC42SE2, CHD6, CTS, DCTN4, DYX1C1, ELAC2, ELK3, GEMIN2, GSK3B, HDAC4, HNRNPF, HOKA13, LHX4, MAP2K6, MKI67, MRAP1, MYCBP, NFE2L1, PCBP1, PHF3, POU2F1, PRUNE, RAB11FIP2, RAB3IP, RAVR1, RNF168, RUNX3, SAP30L, SON, SUZ12, TGOLN2, TRIM69, UTP15, VPS4B, WDR26, ZFP91
CC	GO:0016020	Membrane	31	115	4065	34208	3.1 e-4	AKAP2, APPBP2, ARV1, ASPH, BRI3BP, DOLK, DSE, DYX1C1, FKBP14, GK, GLCE, GOLPH3L, ITM2C, MPP1, MRS2, PCNX, PQLC3, PVRL3, RAB11FIP4, SLC39A9, SNX4, SPRED2, SYNJ2, TMCC1, TMEM123, TMEM170A, TMEM2, TMEM33, TMEM64, TOMM20, VPS4B
CC	GO:0005739	Mitochondrion	14	115	1394	34208	7.2 e-3	AK4, BRI3BP, COQ3, CTS, ELAC2, ELK3, GK, IARS2, IQCE, MRS2, MYCBP, RAB8B, SLC16A1, TOMM20
PW	Kegg:04144	Endocytosis	5	115	193	34208	3.7 e-2	HSPA6, PARD6G, RAB11FIP2, RAB11FIP4, VPS4B

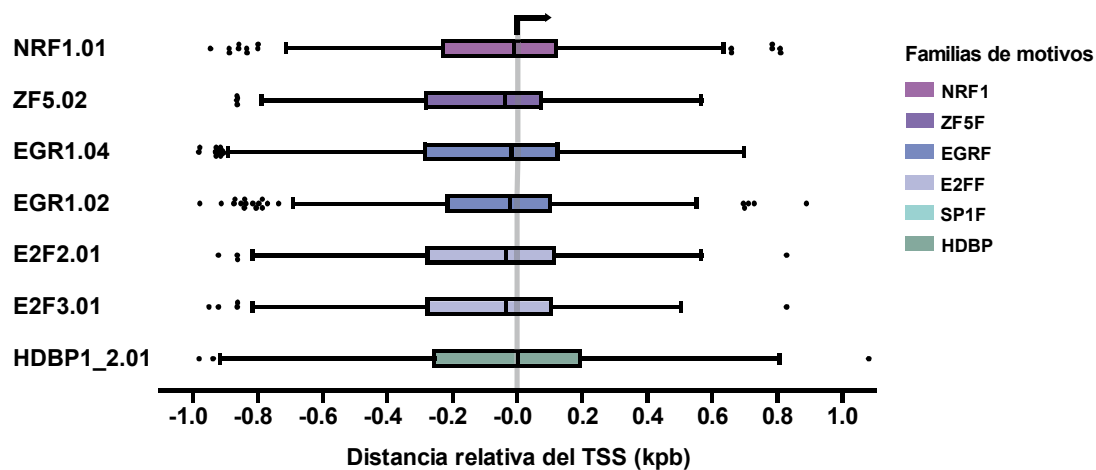
**Suplementaria RS2. Detalle de las secuencias concenso para los motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en promotores de genes regulados por CHD6.**

MOTIVO	SECUENCIA CONSENSO (LOGO)	FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADOS	GENES <sup>1</sup>
NRF1.01		Nuclear respiratory factor 1 (NRF1), bZIP transcription factor that acts on nuclear genes encoding mitochondrial proteins	Down-
NRF1.02		Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	Down-
ZF5.01		Zinc finger / POZ domain transcription factor	Down-/Up-
ZF5.02		ZF5 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161	Down-
ZF5.03		ZF5 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161 (secondary DNA binding preference)	Down-
HDBP1_2.01		Huntington's disease gene regulatory region - binding protein 1 and 2 (SLC2A4 regulator and papillomavirus binding factor)	Down-/Up-
DMTE.01		Drosophila motif ten element	Down-
HMTE.01		Human motif ten element	Down-
BRE.01		Transcription factor II B (TFIIB) recognition element	Down-
E2F.01		E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	Down-
E2F.03		E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	Down-/Up-
E2F1_DP2.01		E2F -1/DP -2 heterodimeric complex	Down-
E2F2.01		E2F transcription factor 2	Down-
E2F3.01		E2F transcription factor 3	Down-
E2F4.01		E2F transcription factor 4, p107/p130 -binding protein	Down-
E2F4_DP2.01		E2F -4/DP -2 heterodimeric complex	Down-

MOTIVO	SECUENCIA CONSENSO (LOGO)	FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADOS	GENES <sup>1</sup>
E2F6.01		E2F transcription factor 6	Down-
CDE.01		Cell cycle -dependent element, CDF -1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	Up-
KLF7.01		Kruppel-like factor 7 (ubiquitous, UKLF)	Down-
CKROX.01		Collagen krox protein (zinc finger protein 67 - zfp67)	Down-
EGR1.01		Egr-1/Krox-24/NGFI-A immediate -early gene product	Down-
EGR1.02		EGR1, early growth response 1	Down-/Up-
EGR1.03		EGR1, early growth response 1	Down-
EGR1.04		EGR1, early growth response 1	Down-
EGR2.01		Egr-2/Krox-20 early growth response gene product	Down-
NGFIC.01		Nerve growth factor -induced protein C	Down-
MAZ.01		Myc associated zinc finger protein (MAZ)	Down-
CTCF.01		CCCTC -binding factor	Down-
CTCF.02		Insulator protein CTCF (CCCTC -binding factor)	Down-
CTCF.04		Insulator protein CTCF (CCCTC -binding factor)	Down-
AHRARNT.03		DRE (dioxin response elements), XRE (xenobiotic response elements) bound by AHR/ARNT heterodimers	Down-
ZNF263.01		Zinc finger protein 263, ZKSCAN12 (zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 12)	Up-

MOTIVO	SECUENCIA CONCENSO (LOGO)	FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADOS	GENES <sup>1</sup>
NRSE.01		Neural -restrictive -silencer -element	<i>Down-</i>
ZFP57.01		Krüppel-associated box -containing zinc finger protein 57 (KRAB -ZFP 57)	<i>Down-</i>
ELK1.01		Elk -1	<i>Down-</i>
ELK4.01		ETS -domain protein (SRF accessory protein 1)	<i>Down-</i>
NUDR.01		NUDR (nuclear DEAF -1 related transcriptional regulator protein)	<i>Down-</i>
VMYB.02		v-Myb	<i>Down-</i>
VMYB.03		v-Myb, viral myb variant from transformed BM2 cells	<i>Down-</i>
VMYB.04		v-Myb, AMV v -Myb	<i>Down-</i>
SP1.01		Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	<i>Down-</i>
SP1.02		Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	<i>Down-</i>
SP1.03		Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	<i>Down-</i>
SP4.01		Sp4 transcription factor	<i>Down-</i>
XCPE1.01		X gene core promoter element 1	<i>Down-</i>

Suplementaria RS3. Localización de motivos enriquecidos de unión a TFs presentes en promotores de genes regulados por CHD6 (z-score>20).



## Suplementaria RS4. Análisis de enriquecimiento de motivos de unión a TFs en los genes NEDD4, GDF15 y HPRT1.

MOTIVO	DESCRIPCIÓN	FAMILIA	P-VALOR	Nº DE APARICIONES OBS.			TOTAL DE APARICIONES OBS.	APARICIONES ESPERADAS	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	Z-SCORE
VSE2F3.01	E2F transcription factor 3	VSE2FF	3.56E-03	17	1	6	24	3.51	1.87	10.68
VSE2F2.01	E2F transcription factor 2	VSE2FF	3.38E-03	17	1	6	24	3.59	1.89	10.51
VSE2F1.01	E2F transcription factor 1	VSE2FF	8.20E-03	8	1	5	14	3.26	1.80	5.68
VSE2F3.02	E2F transcription factor 3 (secondary DNA binding preference)	VSE2FF	2.92E-03	3	1	4	8	2.25	1.50	3.50
VSE2F6.01	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	VSE2FF	2.14E-02	2	1	3	6	2.47	1.57	1.93
VSE2F1.02	E2F transcription factor 6	VSE2FF	1.03E-02	5	1	1	7	3.14	1.77	1.90
VSE2F1_DP2.01	E2F1-1DP2 heterodimeric complex	VSE2FF	4.78E-03	2	1	1	4	1.49	1.22	1.64
VSE2F2.02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	VSE2FF	1.09E-02	1	1	1	3	1.80	1.34	0.52
VSE2F5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	VSE2F5	7.13E-03	18	3	1	22	3.64	1.91	9.37
VSNZF263.02	Zinc finger protein 263, ZKSCAN12 (zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 12)	VSNZF07	1.00E-02	7	2	2	11	2.29	1.51	5.43
VSNZF263.01	Zinc finger protein 263, ZKSCAN12 (zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 12)	VSNZF07	2.19E-02	8	2	3	13	3.98	1.99	4.27
VSAHARNT.02	Aryl hydrocarbon / Arnt heterodimers, fixed core	VSAHRR	5.56E-03	4	2	2	8	1.45	1.20	5.03
VSNXF_ARNT.01	bHLH-PAS type transcription factors NFX/ARNT heterodimer	VSAHRR	4.63E-02	4	0	2	6	1.05	1.03	4.33
VSSALL1.01	Spall-like transcription factor 1	VSSAL1	3.66E-02	1	0	4	5	0.89	0.94	3.83
VSEGR1.04	EGR1, early growth response 1	VSEGRF	1.33E-02	7	1	5	13	4.56	2.13	3.72
VNGFC1.01	Nerve growth factor-induced protein C	VSEGRF	1.57E-02	4	1	3	8	3.05	1.75	2.55
VSEGR1.02	EGR1, early growth response 1	VSEGRF	7.51E-03	3	1	5	9	3.70	1.92	2.50
VSEGR1.01	Egr-1/Krox-24/NGFI-A immediate-early gene product	VSEGRF	1.10E-02	3	1	4	8	3.14	1.77	2.46
VSEGR1.03	EGR1, early growth response 1	VSEGRF	1.94E-02	2	1	2	5	4.19	2.05	0.15
VSWT1.01	Wilms Tumor Suppressor	VSEGRF	2.02E-02	2	1	1	4	3.86	1.96	-0.19
VSMYCMAX.03	MYC-MAX binding sites	VSEBOX	4.93E-03	4	2	1	7	1.80	1.34	3.50
VSMAX.03	MYC associated factor X	VSEBOX	6.94E-03	2	1	1	4	1.95	1.40	1.11
VSSP1.02	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	VSSP1F	1.52E-02	5	2	6	13	4.85	2.20	3.48
VSSP4.01	Sp4 transcription factor	VSSP1F	1.24E-02	3	3	3	9	3.47	1.86	2.70
VSSP1.03	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	VSSP1F	1.54E-02	4	2	5	11	4.95	2.22	2.50
VSGC.01	GC box elements	VSSP1F	3.19E-02	4	3	4	11	5.72	2.39	2.00
VSSP1.01	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	VSSP1F	2.79E-02	4	2	5	11	6.09	2.47	1.79
VSSP2.01	Sp2, member of the Sp/KXLF transcription factors with three C2H2 zinc fingers in a conserved carboxyl-terminal domain	VSSP1F	1.86E-02	2	1	3	6	3.15	1.77	1.32
VSTIEG.01	TGF-beta-inducible early gene (TIEG) / Early growth response gene alpha (EGR alpha)	VSSP1F	1.10E-02	1	1	1	3	1.88	1.37	0.46
VSKLF7.01	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous, UKLF)	VSKLFS	6.58E-03	2	1	5	8	2.32	1.52	3.40
VSKLF8.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	VSKLFS	1.86E-02	1	3	3	7	4.03	2.01	1.23
VSHDBP1_2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (SLC24A regulator and papillomavirus binding factor)	VSHDBP	3.95E-03	2	1	6	9	2.87	1.69	3.32
VSLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	VSLAG	1.92E-02	6	1	4	11	4.14	2.03	3.13
VSLAGL1.01	Pleomorphic adenoma gene-like 1	VSLAG	2.87E-03	1	4	2	7	2.79	1.67	2.22
VSETS1.01	c-Ets-1 binding site	VSETSF	2.11E-02	3	3	1	7	2.35	1.53	2.70
VSEHF.01	Ets homologous factor	VSETSF	1.13E-02	2	1	1	4	1.88	1.37	1.19
VSETV1.02	Ets variant 1	VSETSF	3.03E-02	2	2	1	5	2.71	1.65	1.09
VSETS2.01	c-Ets-2 binding site	VSETSF	3.53E-02	2	2	1	5	2.76	1.66	1.04
VSETV1.01	Ets variant 1	VSETSF	1.51E-02	2	1	1	4	2.14	1.46	0.93
VSP1.04	SP1-1 proto-oncogene, hematopoietic transcription factor PU.1	VSETSF	3.73E-02	2	2	1	5	3.09	1.76	0.80
VSPFA3.01	Polyomavirus enhancer A binding protein 3, ETv4 (Ets variant gene 4)	VSETSF	3.73E-02	1	2	1	4	3.05	1.75	0.26
VSY2.01	Transcription factor yin yang 2	VSY1F	6.31E-03	1	3	1	5	1.38	1.17	2.66
VSY2.02	Transcription factor yin yang 2	VSY1F	1.29E-02	1	1	2	4	1.85	1.36	1.21
VSTAT.01	Signal transducers and activators of transcription	VSTAT	3.21E-02	4	3	1	8	3.22	1.79	2.39
OSHMT.01	Human motif ten element	OSMTEN	3.38E-03	2	1	2	5	1.63	1.28	2.25
OSXCP.01	X gene core promoter element 1	OSXCP	1.66E-02	2	2	4	8	3.64	1.91	2.03
VHFM1.01	HNF-3/Id4 Homolog 1 (FOXQ1)	VFKHD	1.92E-02	2	1	3	6	2.40	1.55	2.00
VFOJ3.01	Forkhead box J3	VFKHD	7.80E-03	1	1	2	4	1.59	1.26	1.52
VHNF3B.03	Hepatic nuclear factor 3 beta (FOXA2)	VFKHD	9.59E-03	1	1	2	4	1.69	1.30	1.39
VFOXK1.01	Forkhead box K1, myocyte nuclear factor	VFKHD	1.61E-02	1	1	2	4	2.10	1.45	0.97
VFOX2.01	Forkhead box protein P2	VFKHD	2.99E-02	1	1	1	3	2.76	1.66	-0.16
VCHREBP_MLX.01	Carbohydrate response element binding protein (CHREBP) and Max-like protein X (Mlx) bind as heterodimers to glucose-responsive promoters	VCHRE	3.32E-03	1	2	1	4	1.34	1.16	1.87
VSMAD4.01	Smad4 transcription factor involved in TGF-beta signaling	VSMAD	6.58E-03	1	2	1	4	1.35	1.16	1.86
VNRL.02	Neural retinal basic leucine zipper factor (bZIP)	VSP1R	7.61E-03	2	1	1	4	1.35	1.16	1.85
VSIK3.02	SIX3 / SIX domain (SD) and Homeodomain (HD) transcription factor	VSIK3	6.42E-03	0	1	1	2	0.39	0.62	1.78
VSGCM1.01	Glial cells missing homolog 1, chorion-specific transcription factor GCMa	VSGCMF	2.34E-02	1	3	2	6	2.64	1.62	1.76
OSVTATA.01	Cellular and viral TATA box elements	OSVTBP	3.09E-02	4	1	3	8	4.07	2.02	1.70
OSATATA.01	Avian C-type LTR TATA box	OSVTBP	4.77E-02	1	1	1	3	3.98	1.99	-0.74
VSLI2.01	GLI-Kruppel family member GLI2	VSLIF	4.98E-02	2	0	1	3	0.93	0.96	1.63
VSLI3.01	GLI-Kruppel family member GLI3	VSLIF	4.50E-02	1	0	1	2	0.90	0.95	0.63
VSSOX12.01	SRY-related HMG-box gene 12	VSSORY	1.61E-02	2	2	1	5	2.15	1.47	1.60
VSSRY.01	Sex-determining region Y gene product	VSSORY	1.38E-02	1	2	1	4	2.00	1.41	1.06
VSSOX3.01	SRY-related HMG-box gene 30	VSSORY	2.06E-02	1	2	1	4	2.36	1.53	0.74
VSSOX7.01	SRY-related HMG-box gene 7	VSSORY	2.02E-02	1	2	1	4	2.40	1.55	0.71
VSSOX5.02	SRY-related HMG-box gene 5	VSSORY	2.25E-02	1	2	1	4	2.52	1.59	0.62
VSSOX13.01	SRY-related HMG-box gene 13	VSSORY	2.35E-02	1	2	1	4	2.66	1.63	0.52
VSSOX15.01	SRY-related HMG-box gene 15	VSSORY	2.75E-02	1	2	1	4	2.86	1.69	0.38
VSSOX5.01	Sox-5	VSSORY	3.34E-02	1	2	1	4	3.16	1.78	0.19
VSTLX1.01	T-cell leukemia homeobox 1	VHOMF	8.51E-03	2	1	1	4	1.54	1.24	1.58
VSNZF202.01	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	VSNZF02	1.22E-02	4	1	1	6	2.96	1.72	1.48
VSGF11.01	Growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	VSGF11	1.91E-02	1	1	0	2	0.51	0.72	1.38
VSNZF19.01	Kruppel-like zinc finger protein 219	VSNZF02	2.28E-02	2	3	2	7	4.71	2.17	0.83
VSBZT.03	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokemon	VSNZF02	3.75E-02	4	1	3	8	6.18	2.48	0.53
VSCCTCF.01	CCCTC-binding factor	VSCCTCF	1.09E-02	4	2	2	8	4.52	2.12	1.40
VSCCTCF.04	Insulator protein CTCF (CCCTC-binding factor)	VSCCTCF	1.29E-02	2	1	2	5	2.50	1.58	1.27
VSPURALPHA.01	Purine-rich element binding protein A	VSPURA	3.79E-02	1	0	2	3	1.11	1.05	1.32
VSRREB1.01	Ras-responsive element binding protein 1	VSRREB	2.89E-02	1	3	2	6	3.40	1.84	1.14
VSNM23.01	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	VSNDPK	3.60E-02	4	2	3	9	5.81	2.41	1.12
VSRF.01	Serum response factor	VSRFF	2.06E-02	2	1	2	5	2.71	1.64	1.09
VSMITB.01	Muscle-specific Mt binding site	VSMITB	2.95E-02	3	1	1	5	2.73	1.65	1.07
VSNKX2.01	NK2 homeobox 2, NKX2BETA	VSNKXH	2.54E-02	0	1	1	2	0.65	0.80	1.06
VSNKX2.01	Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, tinman homolog, high affinity sites	VSNKXH	2.38E-02	0	1	1	2	0.71	0.84	0.94
VSTTF1.02	Thyroid transcription factor-1, NK2 homeobox 1 (Nkx2-1)	VSNKXH	3.97E-02	0	1	1	2	0.80	0.89	0.78
VSNKX2.01	NK2 homeobox 4, NKX 2 DELTA	VSNKXH	4.50E-02	0	1	1	2	0.87	0.93	0.67
VSMYB.01	v-Myb	VSMYBL	3.32E-02	1	2	2	5	2.77	1.66	1.04
VSMYB.05	v-Myb, variant of AMV v-myb	VSMYBL	1.72E-02	1	1	1	3	2.14	1.46	0.25
VSMYB.03	v-Myb, viral myb variant from transformed BM2 cells	VSMYBL	1.73E-02	1	1	1	3	2.15	1.47	0.24
VSBX.01	Motif bound by regulatory factor X (RFX) proteins	VSBXB	3.32E-03	1	1	1	3	1.31	1.14	1.04
VSRFX.01	Regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	VSBXB	1.61E-02	1	1	1	3	1.78	1.33	0.54
VDMRT5.01	Doublesex and mab-3 related transcription factor 5	VDMRT	1.67E-02	1	2	1	4	2.04	1.43	1.02
VSSF1.01	SF1 steroidogenic factor 1	VSSF1F	8.83E-03	1	1	1	3	1.34	1.16	1.01
VSTEAD.01	TEA domain-containing factors, transcriptional enhancer factors 1,3,4,5	VSTEF	1.92E-02	1	2	1	4	2.16	1.47	0.91
VSPIT1.01	Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	VSPIT1	4.49E-03	1	1	1	3	1.48	1.22	0.84
VSNZF354C.01	KRAB-zinc finger protein synten (KID3)	VSNZF08	3.60E-02	0	1	1	2	0.79	0.89	0.79
VSMYOD.01	Myogenic regulatory factor MyoD (myf3)	VSMYOD	6.23E-03	1	1	1	3	1.55	1.24	0.77
VSOCT1.01	Octamer-binding factor 1	VSOCT1	2.99E-02	2	1	2	5	3.13	1.77	0.77
VPOUF3.01	POU class 2 homeobox 3 (POUF2F3)	VSOCT1	4.16E-02	1	1	3	5	3.75	1.94	0.39
VSOCT2.01	Octamer-binding transcription factor-2, POU class 2 homeobox 2 (POUF2F2)	VSOCT1	4.16E-02	1	1	3	5	3.80	1.95	0.36
VDMRT4.01	Doublesex and mab-3 related transcription factor 4	VDMRT	1.92E-02	1	2	1	4	2.37	1.54	0.74
VSPXR_RXR.01	Pregnane X receptor / retinoid X receptor heterodimer, DR4 sites	VSPXR	4.50E-02	0	1	1	2	0.87	0.93	0.67
VIR2_NGRE.01	Repressive binding sites for glucocorticoid receptor (IR2)	VNNGRE	5.48E-03	1	1	1	3	1.66	1.29	0.65
VMAZ.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	VMAZF	2.97E-02	3	2	1	6	4.47	2.11	0.49
VSNRF1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	VSNRF1	8.93E-03	1	1	2	4	2.70	1.64	0.49
VZFP.01	Kruppel-associated box-containing zinc-finger protein 57 (KRAB-ZFP 57)	VZFP	8.51E-03	1	1	1	3	1.90	1.38	0.44
VSHOXD12.01	Homeobox D12 / Hox-4H	VSBDB	1.89E-02	1	1	1	3	2.12	1.45	0.26
VSHOXB9.01	Abd-B-like homeodomain protein Hoxb-9	VSBDB	2.59E-02	1	1	1	3	2.61	1.61	-0.07
VSHMBOX.01	Homeobox containing 1	VSHNF1	3.34E-02	1	1	1	3	2.87	1.69	-0.22
VSBRN5.03	Bm-5, POU-VI protein class (also known as emb and CNS-1)	VSBRN5	3.38E-02	1	1	1	3	3.78	1.94	-0.66



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- AASLAND, R., STEWART, A. F. & GIBSON, T. 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci*, 21, 87-8.
- AGALIOTI, T., CHEN, G. & THANOS, D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, 111, 381-92.
- AL SORKHY, M., CRAIG, R., MARKET, B., ARD, R. & PORTER, L. A. 2009. The cyclin-dependent kinase activator, Spy1A, is targeted for degradation by the ubiquitin ligase NEDD4. *The Journal of biological chemistry*, 284, 2617-27.
- ALBERT, I., MAVRICH, T. N., TOMSHO, L. P., QI, J., ZANTON, S. J., SCHUSTER, S. C. & PUGH, B. F. 2007. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 446, 572-6.
- ALFONSO, R., LUTZ, T., RODRIGUEZ, A., CHAVEZ, J. P., RODRIGUEZ, P., GUTIERREZ, S. & NIETO, A. 2011. CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection. *Cell. Microbiol.*, 13, 1894-1906.
- ALMER, A., RUDOLPH, H., HINNEN, A. & HORZ, W. 1986. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J*, 5, 2689-96.
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. & MIRSKY, A. E. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 786-94.
- ANCELIN, K., LANGE, U. C., HAJKOVA, P., SCHNEIDER, R., BANNISTER, A. J., KOUZARIDES, T. & SURANI, M. A. 2006. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol*, 8, 623-30.
- ANDERSEN, J. S., LYON, C. E., FOX, A. H., LEUNG, A. K., LAM, Y. W., STEEN, H., MANN, M. & LAMOND, A. I. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 12, 1-11.
- ANDERSON, J. D. & WIDOM, J. 2001. Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Mol Cell Biol*, 21, 3830-9.
- BAGCHI, A., PAPAZOGLU, C., WU, Y., CAPURSO, D., BRODT, M., FRANCIS, D., BREDEL, M., VOGEL, H. & MILLS, A. A. 2007. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*, 128, 459-75.
- BAJPAI, R., CHEN, D. A., RADA-IGLESIAS, A., ZHANG, J., XIONG, Y., HELMS, J., CHANG, C. P., ZHAO, Y., SWIGUT, T. & WYSOCKA, J. 2010. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*, 463, 958-62.
- BANNISTER, A. J., SCHNEIDER, R., MYERS, F. A., THORNE, A. W., CRANE-ROBINSON, C. & KOUZARIDES, T. 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem*, 280, 17732-6.
- BAO, Y. & SHEN, X. 2011. SnapShot: Chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell*, 144, 158-158 e2.
- BARONE, M. V., CROZAT, A., TABAEE, A., PHILIPSON, L. & RON, D. 1994. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev*, 8, 453-64.
- BARRERO, M. J. & MALIK, S. 2006. Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Mol Cell*, 24, 233-43.
- BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T. Y., SCHONES, D. E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. & ZHAO, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-37.
- BASEHOAR, A. D., ZANTON, S. J. & PUGH, B. F. 2004. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116, 699-709.
- BECKER, P. B. & HORZ, W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71, 247-73.

- BELYAEV, N. D., HOUBEN, A., BARANCZEWSKI, P. & SCHUBERT, I. 1997. Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle. *Chromosoma*, 106, 193-7.
- BERNSTEIN, B. E., KAMAL, M., LINDBLAD-TOH, K., BEKIRANOV, S., BAILEY, D. K., HUEBERT, D. J., MCMAHON, S., KARLSSON, E. K., KULBOKAS, E. J., 3RD, GINGERAS, T. R., SCHREIBER, S. L. & LANDER, E. S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 120, 169-81.
- BERNSTEIN, B. E., LIU, C. L., HUMPHREY, E. L., PERLSTEIN, E. O. & SCHREIBER, S. L. 2004. Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol*, 5, R62.
- BIRD, A. W., YU, D. Y., PRAY-GRANT, M. G., QIU, Q., HARMON, K. E., MEGEE, P. C., GRANT, P. A., SMITH, M. M. & CHRISTMAN, M. F. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, 419, 411-5.
- BLOMEN, V. A. & BOONSTRA, J. 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci*, 64, 3084-104.
- BOONSTRA, J. 2003. Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J Cell Biochem*, 90, 244-52.
- BOSMAN, E. A., PENN, A. C., AMBROSE, J. C., KETTLEBOROUGH, R., STEMPLE, D. L. & STEEL, K. P. 2005. Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet*, 14, 3463-76.
- BOTUYAN, M. V., LEE, J., WARD, I. M., KIM, J. E., THOMPSON, J. R., CHEN, J. & MER, G. 2006. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127, 1361-73.
- BOWEN, N. J., PALMER, M. B. & WADE, P. A. 2004. Chromosomal regulation by MeCP2: structural and enzymatic considerations. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2163-7.
- BOYER, L. A., LANGER, M. R., CROWLEY, K. A., TAN, S., DENU, J. M. & PETERSON, C. L. 2002. Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell*, 10, 935-42.
- BOYER, L. A., LATEK, R. R. & PETERSON, C. L. 2004. The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 158-63.
- BRACKEN, A. P., CIRO, M., COCITO, A. & HELIN, K. 2004. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci*, 29, 409-17.
- BREHM, A., TUFTELAND, K. R., AASLAND, R. & BECKER, P. B. 2004. The many colours of chromodomains. *Bioessays*, 26, 133-40.
- BRIGGS, S. D., XIAO, T., SUN, Z. W., CALDWELL, J. A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., ALLIS, C. D. & STRAHL, B. D. 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*, 418, 498.
- BROUSTAS, C. G. & LIEBERMAN, H. B. 2014. RAD9 enhances radioresistance of human prostate cancer cells through regulation of ITGB1 protein levels. *Prostate*, 74, 1359-70.
- BROWNELL, J. E. & ALLIS, C. D. 1996. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 176-84.
- BULTMAN, S., GEBUHR, T., YEE, D., LA MANTIA, C., NICHOLSON, J., GILLIAM, A., RANDAZZO, F., METZGER, D., CHAMBON, P., CRABTREE, G. & MAGNUSON, T. 2000. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, 6, 1287-95.
- BULTMAN, S. J., GEBUHR, T. C. & MAGNUSON, T. 2005. A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev*, 19, 2849-61.
- BURATOWSKI, S., HAHN, S., GUARENTE, L. & SHARP, P. A. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, 56, 549-61.
- CAIRNS, B. R. 2005. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 185-90.

- CALDON, C. E., SERGIO, C. M., SCHUTTE, J., BOERSMA, M. N., SUTHERLAND, R. L., CARROLL, J. S. & MUSGROVE, E. A. 2009. Estrogen regulation of cyclin E2 requires cyclin D1 but not c-Myc. *Mol Cell Biol*, 29, 4623-39.
- CAO, R., WANG, H., HE, J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & ZHANG, Y. 2008. Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. *Mol Cell Biol*, 28, 1862-72.
- COBRINIK, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24, 2796-809.
- COTE, J., PETERSON, C. L. & WORKMAN, J. L. 1998. Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4947-52.
- COTE, J., QUINN, J., WORKMAN, J. L. & PETERSON, C. L. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, 265, 53-60.
- CROSS, F. R., BUCHLER, N. E. & SKOTHEIM, J. M. 2011. Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366, 3532-44.
- CHANG, B., CHEN, Y., ZHAO, Y. & BRUICK, R. K. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 318, 444-7.
- CHEN, H. Z., TSAI, S. Y. & LEONE, G. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*, 9, 785-97.
- CHEN, Y. L., LIN, P. C., CHEN, S. P., LIN, C. C., TSAI, N. M., CHENG, Y. L., CHANG, W. L., LIN, S. Z. & HARN, H. J. 2007. Activation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase revealed a isochaihulactone-triggered apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 323, 746-56.
- CHEUNG, P., ALLIS, C. D. & SASSONE-CORSI, P. 2000a. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103, 263-71.
- CHEUNG, P., TANNER, K. G., CHEUNG, W. L., SASSONE-CORSI, P., DENU, J. M. & ALLIS, C. D. 2000b. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, 5, 905-15.
- CHOMCZYNSKI, P. & MACKEY, K. 1995. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 19, 942-5.
- CHOU, D. M., ADAMSON, B., DEPHOURE, N. E., TAN, X., NOTTKE, A. C., HUROV, K. E., GYGI, S. P., COLAIACOVO, M. P. & ELLEDGE, S. J. 2010. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18475-80.
- DACWAG, C. S., OHKAWA, Y., PAL, S., SIF, S. & IMBALZANO, A. N. 2007. The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*, 27, 384-94.
- DAUJAT, S., BAUER, U. M., SHAH, V., TURNER, B., BERGER, S. & KOUZARIDES, T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol*, 12, 2090-7.
- DAUJAT, S., WEISS, T., MOHN, F., LANGE, U. C., ZIEGLER-BIRLING, C., ZEISSLER, U., LAPPE, M., SCHUBELER, D., TORRES-PADILLA, M. E. & SCHNEIDER, R. 2009. H3K64 trimethylation marks heterochromatin and is dynamically remodeled during developmental reprogramming. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 777-81.
- DAUJAT, S., ZEISSLER, U., WALDMANN, T., HAPPEL, N. & SCHNEIDER, R. 2005. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem*, 280, 38090-5.
- DE LA SERNA, I. L., OHKAWA, Y. & IMBALZANO, A. N. 2006. Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet*, 7, 461-73.

- DEB, S. P., SINGH, S. & DEB, S. 2014. MDM2 overexpression, activation of signaling networks, and cell proliferation. *Subcell Biochem*, 85, 215-34.
- DELMAS, V., STOKES, D. G. & PERRY, R. P. 1993. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2414-8.
- DEY, A., CHITSAZ, F., ABBASI, A., MISTELI, T. & OZATO, K. 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8758-63.
- DILLON, S. C., ZHANG, X., TRIEVEL, R. C. & CHENG, X. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*, 6, 227.
- DOERKS, T., COPLEY, R. R., SCHULTZ, J., PONTING, C. P. & BORK, P. 2002. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res*, 12, 47-56.
- EBBERT, R., BIRKMANN, A. & SCHULLER, H. J. 1999. The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol*, 32, 741-51.
- EKHOLM, S. V. & REED, S. I. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 676-84.
- ESNAULT, C., GHAVI-HELM, Y., BRUN, S., SOUTOURINA, J., VAN BERKUM, N., BOSCHIERO, C., HOLSTEGE, F. & WERNER, M. 2008. Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol Cell*, 31, 337-46.
- FALBO, K. B. & SHEN, X. 2006. Chromatin remodeling in DNA replication. *Journal of cellular biochemistry*, 97, 684-9.
- FASCHER, K. D., SCHMITZ, J. & HORZ, W. 1990. Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J*, 9, 2523-8.
- FAZZIO, T. G., KOOPERBERG, C., GOLDMARK, J. P., NEAL, C., BASOM, R., DELROW, J. & TSUKIYAMA, T. 2001. Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 21, 6450-60.
- FENG, Q., WANG, H., NG, H. H., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., STRUHL, K. & ZHANG, Y. 2002. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*, 12, 1052-8.
- FIELD, Y., KAPLAN, N., FONDUFE-MITTENDORF, Y., MOORE, I. K., SHARON, E., LUBLING, Y., WIDOM, J. & SEGAL, E. 2008. Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol*, 4, e1000216.
- FLANAGAN, J. F., BLUS, B. J., KIM, D., CLINES, K. L., RASTINEJAD, F. & KHORASANIZADEH, S. 2007. Molecular implications of evolutionary differences in CHD double chromodomains. *J Mol Biol*, 369, 334-42.
- FLANAGAN, J. F., MI, L. Z., CHRUSZCZ, M., CYMBOROWSKI, M., CLINES, K. L., KIM, Y., MINOR, W., RASTINEJAD, F. & KHORASANIZADEH, S. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, 438, 1181-5.
- FLAUS, A., MARTIN, D. M., BARTON, G. J. & OWEN-HUGHES, T. 2006. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res*, 34, 2887-905.
- FLIERS, E. A., VASQUEZ, A. A., POELMANS, G., ROMMELSE, N., ALTINK, M., BUSCHGENS, C., ASHERSON, P., BANASCHEWSKI, T., EBSTEIN, R., GILL, M., MIRANDA, A., MULAS, F., OADES, R. D., ROEYERS, H., ROTHENBERGER, A., SERGEANT, J., SONUGA-BARKE, E., STEINHAUSEN, H. C., FARAONE, S. V., BUITELAAR, J. K. & FRANKE, B. 2012. Genome-wide association study of motor coordination problems in ADHD identifies genes for brain and muscle function. *World J Biol Psychiatry*, 13, 211-22.

- FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., VILLAR-GAREA, A., BOIX-CHORNET, M., ESPADA, J., SCHOTTA, G., BONALDI, T., HAYDON, C., ROPERO, S., PETRIE, K., IYER, N. G., PEREZ-ROSADO, A., CALVO, E., LOPEZ, J. A., CANO, A., CALASANZ, M. J., COLOMER, D., PIRIS, M. A., AHN, N., IMHOF, A., CALDAS, C., JENUWEIN, T. & ESTELLER, M. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37, 391-400.
- GARDINER-GARDEN, M. & FROMMER, M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196, 261-82.
- GASHLER, A. & SUKHATME, V. P. 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 50, 191-224.
- GASPAR-MAIA, A., ALAJEM, A., POLESSO, F., SRIDHARAN, R., MASON, M. J., HEIDERSBACH, A., RAMALHO-SANTOS, J., MCMANUS, M. T., PLATH, K., MESHORER, E. & RAMALHO-SANTOS, M. 2009. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 460, 863-8.
- GOLKAR, L., DING, X. Z., UJIKI, M. B., SALABAT, M. R., KELLY, D. L., SCHOLTENS, D., FOUGHT, A. J., BENTREM, D. J., TALAMONTI, M. S., BELL, R. H. & ADRIAN, T. E. 2007. Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcriptional induction of macrophage inhibitory cytokine-1. *The Journal of surgical research*, 138, 163-9.
- GOPALAKRISHNAN, S., VAN EMBURGH, B. O. & ROBERTSON, K. D. 2008. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res*, 647, 30-8.
- GOTOH, T., OYADOMARI, S., MORI, K. & MORI, M. 2002. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem*, 277, 12343-50.
- GRAHAM, F. L. & VAN DER EB, A. J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52, 456-67.
- GRANT, P. A., DUGGAN, L., COTE, J., ROBERTS, S. M., BROWNELL, J. E., CANDAU, R., OHBA, R., OWEN-HUGHES, T., ALLIS, C. D., WINSTON, F., BERGER, S. L. & WORKMAN, J. L. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, 11, 1640-50.
- GRUNSTEIN, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- GRUNSTEIN, M. 1998. Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell*, 93, 325-8.
- GUCCIONE, E., BASSI, C., CASADIO, F., MARTINATO, F., CESARONI, M., SCHUCHLAUTZ, H., LUSCHER, B. & AMATI, B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*, 449, 933-7.
- GUI, Y., GUO, G., HUANG, Y., HU, X., TANG, A., GAO, S., WU, R., CHEN, C., LI, X., ZHOU, L., HE, M., LI, Z., SUN, X., JIA, W., CHEN, J., YANG, S., ZHOU, F., ZHAO, X., WAN, S., YE, R., LIANG, C., LIU, Z., HUANG, P., LIU, C., JIANG, H., WANG, Y., ZHENG, H., SUN, L., LIU, X., JIANG, Z., FENG, D., WU, S., ZOU, J., ZHANG, Z., YANG, R., ZHAO, J., XU, C., YIN, W., GUAN, Z., YE, J., ZHANG, H., LI, J., KRISTIANSEN, K., NICKERSON, M. L., THEODORESCU, D., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., WANG, J., YANG, H. & CAI, Z. 2011. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics*, 43, 875-8.
- GUIDI, C. J., SANDS, A. T., ZAMBROWICZ, B. P., TURNER, T. K., DEMERS, D. A., WEBSTER, W., SMITH, T. W., IMBALZANO, A. N. & JONES, S. N. 2001. Disruption of *Ini1* leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. *Mol Cell Biol*, 21, 3598-603.
- GUILLEMETTE, B., BATAILLE, A. R., GEVRY, N., ADAM, M., BLANCHETTE, M., ROBERT, F. & GAUDREAU, L. 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol*, 3, e384.

- HABASHY, H. O., POWE, D. G., GLAAB, E., BALL, G., SPITERI, I., KRASNOGOR, N., GARIBALDI, J. M., RAKHA, E. A., GREEN, A. R., CALDAS, C. & ELLIS, I. O. 2011. RERG (Ras-like, oestrogen-regulated, growth-inhibitor) expression in breast cancer: a marker of ER-positive luminal-like subtype. *Breast Cancer Res Treat*, 128, 315-26.
- HAMPSEY, M. & REINBERG, D. 2003. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell*, 113, 429-32.
- HAN, M. & GRUNSTEIN, M. 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, 55, 1137-45.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HENDZEL, M. J., WEI, Y., MANCINI, M. A., VAN HOOSER, A., RANALLI, T., BRINKLEY, B. R., BAZETT-JONES, D. P. & ALLIS, C. D. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106, 348-60.
- HOLLEY, D., GROH, B. S., WOZNIAK, G., DONOHOE, D. R., SUN, W., GODFREY, V. & BULTMAN, S. J. 2013. The BRG1 chromatin remodeler regulates widespread changes in gene expression and cell proliferation during B cell activation. *Journal of cellular physiology*.
- HOLLIDAY, R. 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1, 76-80.
- HOUBEN, A., WAKO, T., FURUSHIMA-SHIMOAWARA, R., PRESTING, G., KUNZEL, G., SCHUBERT, I. I. & FUKUI, K. 1999. Short communication: the cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J*, 18, 675-9.
- HUANG, S., LITT, M. & FELSENFELD, G. 2005. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev*, 19, 1885-93.
- HUBLITZ, P., ALBERT, M. & PETERS, A. H. 2009. Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *Int J Dev Biol*, 53, 335-54.
- HUEN, M. S., SY, S. M., VAN DEURSEN, J. M. & CHEN, J. 2008. Direct interaction between SET8 and proliferating cell nuclear antigen couples H4-K20 methylation with DNA replication. *J Biol Chem*, 283, 11073-7.
- HUISINGA, K. L. & PUGH, B. F. 2004. A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 13, 573-85.
- HULO, N., SIGRIST, C. J., LE SAUX, V., LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S., BORDOLI, L., GATTIKER, A. & DE CASTRO, E. 2004. Recent improvements to the PROSITE database. 32, D134-7.
- HURD, E. A., POUCHER, H. K., CHENG, K., RAPHAEL, Y. & MARTIN, D. M. 2010. The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD7 regulates pro-neural gene expression and neurogenesis in the inner ear. *Development*, 137, 3139-50.
- HYLLUS, D., STEIN, C., SCHNABEL, K., SCHILTZ, E., IMHOF, A., DOU, Y., HSIEH, J. & BAUER, U. M. 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev*, 21, 3369-80.
- IKURA, T., OGRYZKO, V. V., GRIGORIEV, M., GROISMAN, R., WANG, J., HORIKOSHI, M., SCULLY, R., QIN, J. & NAKATANI, Y. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 102, 463-73.
- IOSHIKHES, I. P., ALBERT, I., ZANTON, S. J. & PUGH, B. F. 2006. Nucleosome positions predicted through comparative genomics. *Nat Genet*, 38, 1210-5.
- ISHIHARA, K., OSHIMURA, M. & NAKAO, M. 2006. CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell*, 23, 733-42.
- ITO, T., BULGER, M., PAZIN, M. J., KOBAYASHI, R. & KADONAGA, J. T. 1997. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90, 145-55.



- IYER, V. & STRUHL, K. 1995. Mechanism of differential utilization of the his3 TR and TC TATA elements. *Mol Cell Biol*, 15, 7059-66.
- JENUWEIN, T. & ALLIS, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.
- JEPPESEN, P. 1997. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *Bioessays*, 19, 67-74.
- JEPPESEN, P. & TURNER, B. M. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74, 281-9.
- JIANG, C. & PUGH, B. F. 2009. A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol*, 10, R109.
- JIRALERSPONG, S. & PATEL, P. I. 1996. Regulation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene: in vitro and in vivo approaches. *Proc Soc Exp Biol Med*, 212, 116-27.
- JOHNSON, D. G., SCHWARZ, J. K., CRESS, W. D. & NEVINS, J. R. 1993. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 365, 349-52.
- JONES, P. A. & TAKAI, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293, 1068-70.
- JOUVERT, P., DIETRICH, J. B., AUNIS, D. & ZWILLER, J. 2002. Differential rat brain expression of EGR proteins and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration. *Neuromolecular Med*, 1, 137-51.
- KADONAGA, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*, 116, 247-57.
- KALDIS, P. 1999. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci*, 55, 284-96.
- KALSCHEUER, V. M., FEENSTRA, I., VAN RAVENSWAALJ-ARTS, C. M., SMEETS, D. F., MENZEL, C., ULLMANN, R., MUSANTE, L. & ROPERS, H. H. 2008. Disruption of the TCF4 gene in a girl with mental retardation but without the classical Pitt-Hopkins syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A, 2053-9.
- KAMAKAKA, R. T. & BIGGINS, S. 2005. Histone variants: deviants? *Genes Dev*, 19, 295-310.
- KAPLAN, N., MOORE, I. K., FONDUFE-MITTENDORF, Y., GOSSETT, A. J., TILLO, D., FIELD, Y., LEPROUST, E. M., HUGHES, T. R., LIEB, J. D., WIDOM, J. & SEGAL, E. 2009. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, 458, 362-6.
- KARACHENTSEV, D., SARMA, K., REINBERG, D. & STEWARD, R. 2005. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev*, 19, 431-5.
- KEHLE, J., BEUCHLE, D., TREUHEIT, S., CHRISTEN, B., KENNISON, J. A., BIENZ, M. & MULLER, J. 1998. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science*, 282, 1897-900.
- KIM, J., DANIEL, J., ESPEJO, A., LAKE, A., KRISHNA, M., XIA, L., ZHANG, Y. & BEDFORD, M. T. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep*, 7, 397-403.
- KIM, J. K., HUH, S. O., CHOI, H., LEE, K. S., SHIN, D., LEE, C., NAM, J. S., KIM, H., CHUNG, H., LEE, H. W., PARK, S. D. & SEONG, R. H. 2001. Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development. *Mol Cell Biol*, 21, 7787-95.
- KINGSTON, R. E. & NARLIKAR, G. J. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*, 13, 2339-52.
- KIZER, K. O., PHATNANI, H. P., SHIBATA, Y., HALL, H., GREENLEAF, A. L. & STRAHL, B. D. 2005. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol*, 25, 3305-16.

- KOH, S. S., CHEN, D., LEE, Y. H. & STALLCUP, M. R. 2001. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, 276, 1089-98.
- KOHLMAIER, A., SAVARESE, F., LACHNER, M., MARTENS, J., JENUWEIN, T. & WUTZ, A. 2004. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol*, 2, E171.
- KOMARNITSKY, P., CHO, E. J. & BURATOWSKI, S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*, 14, 2452-60.
- KORBER, P. & HORZ, W. 2004. In vitro assembly of the characteristic chromatin organization at the yeast PHO5 promoter by a replication-independent extract system. *J Biol Chem*, 279, 35113-20.
- KOUZARIDES, T. 2007a. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- KOUZARIDES, T. 2007b. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*, 128, 802.
- KROGAN, N. J., KIM, M., TONG, A., GOLSHANI, A., CAGNEY, G., CANADIEN, V., RICHARDS, D. P., BEATTIE, B. K., EMILI, A., BOONE, C., SHILATIFARD, A., BURATOWSKI, S. & GREENBLATT, J. 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 23, 4207-18.
- KURAS, L. & STRUHL, K. 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, 399, 609-13.
- KUZMICHEV, A., JENUWEIN, T., TEMPST, P. & REINBERG, D. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell*, 14, 183-93.
- KWON, H., IMBALZANO, A. N., KHAVARI, P. A., KINGSTON, R. E. & GREEN, M. R. 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature*, 370, 477-81.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMBERT, J. R., KELLY, J. A., SHIM, M., HUFFER, W. E., NORDEEN, S. K., BAEK, S. J., ELING, T. E. & LUCIA, M. S. 2006. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *Journal of cellular physiology*, 208, 566-74.
- LANGST, G., BONTE, E. J., CORONA, D. F. & BECKER, P. B. 1999. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell*, 97, 843-52.
- LATHROP, M. J., CHAKRABARTI, L., ENG, J., RHODES, C. H., LUTZ, T., NIETO, A., LIGGITT, H. D., WARNER, S., FIELDS, J., STOGER, R. & FIERING, S. 2010. Deletion of the Chd6 exon 12 affects motor coordination. *Mamm Genome*, 21, 130-42.
- LAYMAN, W. S., MCEWEN, D. P., BEYER, L. A., LALANI, S. R., FERNBACH, S. D., OH, E., SWAROOP, A., HEGG, C. C., RAPHAEL, Y., MARTENS, J. R. & MARTIN, D. M. 2009. Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in Chd7 deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet*, 18, 1909-23.
- LE GUEZENNEC, X., VERMEULEN, M., BRINKMAN, A. B., HOEIJMAKERS, W. A., COHEN, A., LASONDER, E. & STUNNENBERG, H. G. 2006. MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol*, 26, 843-51.
- LEE, C. K., SHIBATA, Y., RAO, B., STRAHL, B. D. & LIEB, J. D. 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet*, 36, 900-5.
- LEE, J. S. & SHILATIFARD, A. 2007. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat Res*, 618, 130-4.

- LEE, W., TILLO, D., BRAY, N., MORSE, R. H., DAVIS, R. W., HUGHES, T. R. & NISLOW, C. 2007. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, 39, 1235-44.
- LI, A., EIRIN-LOPEZ, J. M. & AUSIO, J. 2005. H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol*, 83, 505-15.
- LI, B., CAREY, M. & WORKMAN, J. L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128, 707-19.
- LI, E., BESTOR, T. H. & JAENISCH, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-26.
- LI, J., RAN, C., LI, E., GORDON, F., COMSTOCK, G., SIDDIQUI, H., CLEGHORN, W., CHEN, H. Z., KORNACKER, K., LIU, C. G., PANDIT, S. K., KHANIZADEH, M., WEINSTEIN, M., LEONE, G. & DE BRUIN, A. 2008. Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell*, 14, 62-75.
- LI, P. X., WONG, J., AYED, A., NGO, D., BRADE, A. M., ARROWSMITH, C., AUSTIN, R. C. & KLAMUT, H. J. 2000. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *The Journal of biological chemistry*, 275, 20127-35.
- LI, X. Y., VIRBASIS, A., ZHU, X. & GREEN, M. R. 1999. Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature*, 399, 605-9.
- LITT, M., QIU, Y. & HUANG, S. 2009. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep*, 29, 131-41.
- LIU, P. Y., XU, N., MALYUKOVA, A., SCARLETT, C. J., SUN, Y. T., ZHANG, X. D., LING, D., SU, S. P., NELSON, C., CHANG, D. K., KOACH, J., TEE, A. E., HABER, M., NORRIS, M. D., TOON, C., ROOMAN, I., XUE, C., CHEUNG, B. B., KUMAR, S., MARSHALL, G. M., BIANKIN, A. V. & LIU, T. 2013. The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell death and differentiation*, 20, 503-14.
- LO, W. S., TRIEVEL, R. C., ROJAS, J. R., DUGGAN, L., HSU, J. Y., ALLIS, C. D., MARMORSTEIN, R. & BERGER, S. L. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, 5, 917-26.
- LOHR, D. 1997. Nucleosome transactions on the promoters of the yeast GAL and PHO genes. *J Biol Chem*, 272, 26795-8.
- LORCH, Y., LAPOINTE, J. W. & KORNBERG, R. D. 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, 49, 203-10.
- LOWARY, P. T. & WIDOM, J. 1998. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol*, 276, 19-42.
- LUGER, K. & HANSEN, J. C. 2005. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 188-96.
- LUGER, K., RECHSTEINER, T. J., FLAUS, A. J., WAYE, M. M. & RICHMOND, T. J. 1997. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*, 272, 301-11.
- LUNDGREN, K., MONTES DE OCA LUNA, R., MCNEILL, Y. B., EMERICK, E. P., SPENCER, B., BARFIELD, C. R., LOZANO, G., ROSENBERG, M. P. & FINLAY, C. A. 1997. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev*, 11, 714-25.
- LUTZ, T., STÖGER, R. & NIETO, A. 2006. CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett*, 580, 5851-7.
- MADISEN, L., KRUMM, A., HEBBES, T. R. & GROUDINE, M. 1998. The immunoglobulin heavy chain locus control region increases histone acetylation along linked c-myc genes. *Mol Cell Biol*, 18, 6281-92.
- MAJUMDER, S., ALINARI, L., ROY, S., MILLER, T., DATTA, J., SIF, S., BAIOCCHI, R. & JACOB, S. T. 2010. Methylation of histone H3 and H4 by PRMT5 regulates ribosomal RNA gene transcription. *J Cell Biochem*, 109, 553-63.

- MALUMBRES, M. 2005. Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle*, 4, 206-10.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 222-31.
- MARFELLA, C. G., OHKAWA, Y., COLES, A. H., GARLICK, D. S., JONES, S. N. & IMBALZANO, A. N. 2006. Mutation of the SNF2 family member Chd2 affects mouse development and survival. *J Cell Physiol*, 209, 162-71.
- MAROM, R., SHUR, I., HAGER, G. L. & BENAYAHU, D. 2006. Expression and regulation of CReMM, a chromodomain helicase-DNA-binding (CHD), in marrow stroma derived osteoprogenitors. *J Cell Physiol*, 207, 628-35.
- MARTIENSSSEN, R. A. & COLOT, V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 293, 1070-4.
- MARTINEZ-CAMPA, C., POLITIS, P., MOREAU, J. L., KENT, N., GOODALL, J., MELLOR, J. & GODING, C. R. 2004. Precise nucleosome positioning and the TATA box dictate requirements for the histone H4 tail and the bromodomain factor Bdf1. *Mol Cell*, 15, 69-81.
- MATSUMOTO, M., MINAMI, M., TAKEDA, K., SAKAO, Y. & AKIRA, S. 1996. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett*, 395, 143-7.
- MAVRICH, T. N., IOSHIKHES, I. P., VENTERS, B. J., JIANG, C., TOMSHO, L. P., QI, J., SCHUSTER, S. C., ALBERT, I. & PUGH, B. F. 2008. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res*, 18, 1073-83.
- MAYTIN, E. V., UBEDA, M., LIN, J. C. & HABENER, J. F. 2001. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res*, 267, 193-204.
- MCBLANE, F. & BOYES, J. 2000. Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. *Curr Biol*, 10, 483-6.
- MCMURRY, M. T. & KRANGEL, M. S. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science*, 287, 495-8.
- MEISSNER, A., MIKKELSEN, T. S., GU, H., WERNIG, M., HANNA, J., SIVACHENKO, A., ZHANG, X., BERNSTEIN, B. E., NUSBAUM, C., JAFFE, D. B., GNIRKE, A., JAENISCH, R. & LANDER, E. S. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454, 766-70.
- MERCIER, G., TURQUE, N. & SCHUMACHER, M. 2001. Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. 97, 137-48.
- METZNER, A., PRECHT, C., FEHSE, B., FIEDLER, W., STOCKING, C., GUNTHER, A., MAYR, G. W. & JUCKER, M. 2009. Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D. *Gene Ther*, 16, 570-3.
- MIKKELSEN, T. S., KU, M., JAFFE, D. B., ISSAC, B., LIEBERMAN, E., GIANNOUKOS, G., ALVAREZ, P., BROCKMAN, W., KIM, T. K., KOCH, R. P., LEE, W., MENDENHALL, E., O'DONOVAN, A., PRESSER, A., RUSS, C., XIE, X., MEISSNER, A., WERNIG, M., JAENISCH, R., NUSBAUM, C., LANDER, E. S. & BERNSTEIN, B. E. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448, 553-60.
- MIN, J., FENG, Q., LI, Z., ZHANG, Y. & XU, R. M. 2003. Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell*, 112, 711-23.
- MIZZEN, C. A., YANG, X. J., KOKUBO, T., BROWNELL, J. E., BANNISTER, A. J., OWEN-HUGHES, T., WORKMAN, J., WANG, L., BERGER, S. L., KOUZARIDES, T., NAKATANI, Y. & ALLIS, C. D. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, 87, 1261-70.
- MOAZED, D. 2001. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 232-8.

- MOHRMANN, L. & VERRIJZER, C. P. 2005. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1681, 59-73.
- MORGAN, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 261-91.
- MORILLON, A., KARABETSOU, N., NAIR, A. & MELLOR, J. 2005. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Mol Cell*, 18, 723-34.
- MOTTET, D., PIROTTE, S., LAMOUR, V., HAGEDORN, M., JAVERZAT, S., BIKFALVI, A., BELLAHCENE, A., VERDIN, E. & CASTRONOVO, V. 2009. HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism. *Oncogene*, 28, 243-56.
- MUSSELMAN, C. A., LALONDE, M. E., COTE, J. & KUTATELADZE, T. G. 2012a. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 1218-27.
- MUSSELMAN, C. A., RAMIREZ, J., SIMS, J. K., MANSFIELD, R. E., OLIVER, S. S., DENU, J. M., MACKAY, J. P., WADE, P. A., HAGMAN, J. & KUTATELADZE, T. G. 2012b. Bivalent recognition of nucleosomes by the tandem PHD fingers of the CHD4 ATPase is required for CHD4-mediated repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 787-92.
- NAKAYAMA, J., RICE, J. C., STRAHL, B. D., ALLIS, C. D. & GREWAL, S. I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 292, 110-3.
- NG, H. H., ROBERT, F., YOUNG, R. A. & STRUHL, K. 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, 11, 709-19.
- NIELSEN, A. L., OULAD-ABDELGHANI, M., ORTIZ, J. A., REMBOUTSIKA, E., CHAMBON, P. & LOSSON, R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell*, 7, 729-39.
- NIOI, P., NGUYEN, T., SHERRATT, P. J. & PICKETT, C. B. 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 25, 10895-906.
- NISHIKAWA, J., KOKUBO, T., HORIKOSHI, M., ROEDER, R. G. & NAKATANI, Y. 1997. Drosophila TAF(II)230 and the transcriptional activator VP16 bind competitively to the TATA box-binding domain of the TATA box-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 85-90.
- NISHIYAMA, M., OSHIKAWA, K., TSUKADA, Y., NAKAGAWA, T., IEMURA, S., NATSUME, T., FAN, Y., KIKUCHI, A., SKOULTCHI, A. I. & NAKAYAMA, K. I. 2009. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 11, 172-82.
- O'DONOVAN, K. J., WILKENS, E. P. & BARABAN, J. M. 1998. Sequential expression of Egr-1 and Egr-3 in hippocampal granule cells following electroconvulsive stimulation. *J Neurochem*, 70, 1241-8.
- OGAS, J., KAUFMANN, S., HENDERSON, J. & SOMERVILLE, C. 1999. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13839-44.
- OGAWA, H., ISHIGURO, K., GAUBATZ, S., LIVINGSTON, D. M. & NAKATANI, Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 296, 1132-6.
- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A. & LI, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.
- ORPHANIDES, G. & REINBERG, D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*, 108, 439-51.

- OYADOMARI, S., KOIZUMI, A., TAKEDA, K., GOTOH, T., AKIRA, S., ARAKI, E. & MORI, M. 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest*, 109, 525-32.
- OYADOMARI, S., TAKEDA, K., TAKIGUCHI, M., GOTOH, T., MATSUMOTO, M., WADA, I., AKIRA, S., ARAKI, E. & MORI, M. 2001. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10845-50.
- PEGORARO, G., KUBBEN, N., WICKERT, U., GOHLER, H., HOFFMANN, K. & MISTELI, T. 2009. Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol*, 11, 1261-7.
- PESAVENTO, J. J., YANG, H., KELLEHER, N. L. & MIZZEN, C. A. 2008. Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 28, 468-86.
- PETERS, A. H., MERMOUD, J. E., O'CARROLL, D., PAGANI, M., SCHWEIZER, D., BROCKDORFF, N. & JENUWEIN, T. 2002. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, 30, 77-80.
- PHILLIPS, D. M. 1963. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J*, 87, 258-63.
- PLATH, K., FANG, J., MLYNARCZYK-EVANS, S. K., CAO, R., WORRINGER, K. A., WANG, H., DE LA CRUZ, C. C., OTTE, A. P., PANNING, B. & ZHANG, Y. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, 300, 131-5.
- POKHOLOK, D. K., HARBISON, C. T., LEVINE, S., COLE, M., HANNETT, N. M., LEE, T. I., BELL, G. W., WALKER, K., ROLFE, P. A., HERBOLSHEIMER, E., ZEITLINGER, J., LEWITTER, F., GIFFORD, D. K. & YOUNG, R. A. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122, 517-27.
- POLO, S. E., KAIDI, A., BASKCOMB, L., GALANTY, Y. & JACKSON, S. P. 2010. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J*, 29, 3130-9.
- POOT, R. A., BOZHENOK, L., VAN DEN BERG, D. L., HAWKES, N. & VARGA-WEISZ, P. D. 2005. Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance? *Cell cycle*, 4, 543-6.
- PRAY-GRANT, M. G., DANIEL, J. A., SCHIELTZ, D., YATES, J. R., 3RD & GRANT, P. A. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, 433, 434-8.
- PROCHASSON, P., NEELY, K. E., HASSAN, A. H., LI, B. & WORKMAN, J. L. 2003. Targeting activity is required for SWI/SNF function in vivo and is accomplished through two partially redundant activator-interaction domains. *Mol Cell*, 12, 983-90.
- PTASHNE, M. & GANN, A. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386, 569-77.
- PUGH, B. F. 2000. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, 255, 1-14.
- PUGH, B. F. & TJIAN, R. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev*, 5, 1935-45.
- QUINN, J., FYRBERG, A. M., GANSTER, R. W., SCHMIDT, M. C. & PETERSON, C. L. 1996. DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, 379, 844-7.
- RAISNER, R. M., HARTLEY, P. D., MENEGHINI, M. D., BAO, M. Z., LIU, C. L., SCHREIBER, S. L., RANDO, O. J. & MADHANI, H. D. 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123, 233-48.
- RANDO, O. J. & CHANG, H. Y. 2009. Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem*, 78, 245-71.
- RAO, B., SHIBATA, Y., STRAHL, B. D. & LIEB, J. D. 2005. Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol Cell Biol*, 25, 9447-59.
- REA, S., EISENHABER, F., O'CARROLL, D., STRAHL, B. D., SUN, Z. W., SCHMID, M., OPRAVIL, S., MECHTLER, K., PONTING, C. P., ALLIS, C. D. & JENUWEIN, T.

2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593-9.
- REINER, S. L. 2005. Epigenetic control in the immune response. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1, R41-6.
- REISMAN, D., GLAROS, S. & THOMPSON, E. A. 2009. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene*, 28, 1653-68.
- RICHARDS, E. J. & ELGIN, S. C. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, 489-500.
- RODRIGUEZ-PAREDES, M., CEBALLOS-CHAVEZ, M., ESTELLER, M., GARCIA-DOMINGUEZ, M. & REYES, J. C. 2009. The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic Acids Res*, 37, 2449-60.
- RODRIGUEZ, A. 2009. *Acoplamiento funcional entre el virus de la gripe y la maquinaria de transcripción celular. Relación con la patogenicidad viral*. Ph.D, Madrid.
- SANTOS-ROSA, H., SCHNEIDER, R., BERNSTEIN, B. E., KARABETSOV, N., MORILLON, A., WEISE, C., SCHREIBER, S. L., MELLOR, J. & KOUZARIDES, T. 2003. Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell*, 12, 1325-32.
- SARG, B., KOUTZAMANI, E., HELLIGER, W., RUNDQUIST, I. & LINDNER, H. H. 2002. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem*, 277, 39195-201.
- SARMA, K. & REINBERG, D. 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 139-49.
- SATYANARAYANA, A. & KALDIS, P. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28, 2925-39.
- SAXONOV, S., BERG, P. & BRUTLAG, D. L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1412-7.
- SCHNETZ, M. P., BARTELS, C. F., SHASTRI, K., BALASUBRAMANIAN, D., ZENTNER, G. E., BALAJI, R., ZHANG, X., SONG, L., WANG, Z., LAFRAMBOISE, T., CRAWFORD, G. E. & SCACHERI, P. C. 2009. Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Res*, 19, 590-601.
- SCHNETZ, M. P., HANDOKO, L., AKHTAR-ZAIDI, B., BARTELS, C. F., PEREIRA, C. F., FISHER, A. G., ADAMS, D. J., FLICEK, P., CRAWFORD, G. E., LAFRAMBOISE, T., TESAR, P., WEI, C. L. & SCACHERI, P. C. 2010. CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific gene expression. *PLoS Genet*, 6, e1001023.
- SCHONES, D. E., CUI, K., CUDDAPAH, S., ROH, T. Y., BARSKI, A., WANG, Z., WEI, G. & ZHAO, K. 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 132, 887-98.
- SCHOTTA, G., LACHNER, M., SARMA, K., EBERT, A., SENGUPTA, R., REUTER, G., REINBERG, D. & JENUWEIN, T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, 18, 1251-62.
- SCHOTTA, G., SENGUPTA, R., KUBICEK, S., MALIN, S., KAUER, M., CALLEN, E., CELESTE, A., PAGANI, M., OPRAVIL, S., DE LA ROSA-VELAZQUEZ, I. A., ESPEJO, A., BEDFORD, M. T., NUSSENZWEIG, A., BUSSLINGER, M. & JENUWEIN, T. 2008. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev*, 22, 2048-61.
- SCHUBELER, D., MACALPINE, D. M., SCALZO, D., WIRBELAUER, C., KOOPERBERG, C., VAN LEEUWEN, F., GOTTSCHLING, D. E., O'NEILL, L. P., TURNER, B. M., DELROW, J., BELL, S. P. & GROUDINE, M. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*, 18, 1263-71.

- SEET, B. T., DIKIC, I., ZHOU, M. M. & PAWSON, T. 2006. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 473-83.
- SEGAL, E., FONDUFE-MITTENDORF, Y., CHEN, L., THASTROM, A., FIELD, Y., MOORE, I. K., WANG, J. P. & WIDOM, J. 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442, 772-8.
- SEGAL, E. & WIDOM, J. 2009. Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 65-71.
- SEKINGER, E. A., MOQTADERI, Z. & STRUHL, K. 2005. Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell*, 18, 735-48.
- SERMWITTAYAWONG, D. & TAN, S. 2006. SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. *EMBO J*, 25, 3791-800.
- SHEN, L., KONDO, Y., GUO, Y., ZHANG, J., ZHANG, L., AHMED, S., SHU, J., CHEN, X., WATERLAND, R. A. & ISSA, J. P. 2007. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*, 3, 2023-36.
- SHEN, X., MIZUGUCHI, G., HAMICHE, A. & WU, C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406, 541-4.
- SHEN, Y., CHOW, J., WANG, Z. & FAN, G. 2006. Abnormal CpG island methylation occurs during in vitro differentiation of human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet*, 15, 2623-35.
- SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13, 1501-12.
- SHIM, E. Y., WOODCOCK, C. & ZARET, K. S. 1998. Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev*, 12, 5-10.
- SHIMADA, K., OMA, Y., SCHLEKER, T., KUGOU, K., OHTA, K., HARATA, M. & GASSER, S. M. 2008. Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol*, 18, 566-75.
- SHIVASWAMY, S. & IYER, V. R. 2008. Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. *Mol Cell Biol*, 28, 2221-34.
- SHOGREN-KNAAK, M., ISHII, H., SUN, J. M., PAZIN, M. J., DAVIE, J. R. & PETERSON, C. L. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311, 844-7.
- SHUR, I. & BENAYAHU, D. 2005. Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *J Mol Biol*, 352, 646-55.
- SIMS, R. J., 3RD, CHEN, C. F., SANTOS-ROSA, H., KOUZARIDES, T., PATEL, S. S. & REINBERG, D. 2005. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem*, 280, 41789-92.
- SIMS, R. J., 3RD, MILLHOUSE, S., CHEN, C. F., LEWIS, B. A., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., MANLEY, J. L. & REINBERG, D. 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 28, 665-76.
- SMEENK, G., WIEGANT, W. W., VROLIJK, H., SOLARI, A. P., PASTINK, A. & VAN ATTIKUM, H. 2010. The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J Cell Biol*, 190, 741-9.
- SOBEL, R. E., COOK, R. G., PERRY, C. A., ANNUNZIATO, A. T. & ALLIS, C. D. 1995. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1237-41.
- SOLARI, F. & AHRINGER, J. 2000. NURD-complex genes antagonise Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 10, 223-6.
- SPENCER, V. A. & DAVIE, J. R. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240, 1-12.



- SRINIVASAN, L., PAN, X. & ATCHISON, M. L. 2005. Transient requirements of YY1 expression for PcG transcriptional repression and phenotypic rescue. *J Cell Biochem*, 96, 689-99.
- SRINIVASAN, S., DORIGHI, K. M. & TAMKUN, J. W. 2008. Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet*, 4, e1000217.
- STOPKA, T. & SKOULTCHI, A. I. 2003. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14097-102.
- STRAHL, B. D. & ALLIS, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-5.
- STRUHL, K. 1985. Negative control at a distance mediates catabolite repression in yeast. *Nature*, 317, 822-4.
- STRUHL, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*, 12, 599-606.
- SUBTIL-RODRIGUEZ, A., VAZQUEZ-CHAVEZ, E., CEBALLOS-CHAVEZ, M., RODRIGUEZ-PAREDES, M., MARTIN-SUBERO, J. I., ESTELLER, M. & REYES, J. C. 2014. The chromatin remodeller CHD8 is required for E2F-dependent transcription activation of S-phase genes. *Nucleic Acids Res*, 42, 2185-96.
- SUDARSANAM, P. & WINSTON, F. 2000. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*, 16, 345-51.
- SUMITOMO, S., FUJIO, K., OKAMURA, T. & YAMAMOTO, K. 2013. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT*, 2, e23952.
- SUN, Z. W. & ALLIS, C. D. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418, 104-8.
- SURAPUREDDI, S., VISWAKARMA, N., YU, S., GUO, D., RAO, M. S. & REDDY, J. K. 2006. PRIC320, a transcription coactivator, isolated from peroxisome proliferator-binding protein complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 343, 535-43.
- TADDEI, A., ROCHE, D., SIBARITA, J. B., TURNER, B. M. & ALMOUZNI, G. 1999. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol*, 147, 1153-66.
- TAKADA, I., MIHARA, M., SUZAWA, M., OHTAKE, F., KOBAYASHI, S., IGARASHI, M., YOUN, M. Y., TAKEYAMA, K., NAKAMURA, T., MEZAKI, Y., TAKEZAWA, S., YOGIASHI, Y., KITAGAWA, H., YAMADA, G., TAKADA, S., MINAMI, Y., SHIBUYA, H., MATSUMOTO, K. & KATO, S. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol*, 9, 1273-85.
- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3740-5.
- TAYLOR, I. C., WORKMAN, J. L., SCHUETZ, T. J. & KINGSTON, R. E. 1991. Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains. *Genes Dev*, 5, 1285-98.
- THOMAS, M. C. & CHIANG, C. M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41, 105-78.
- THOMPSON, B. A., TREMBLAY, V., LIN, G. & BOCHAR, D. A. 2008. CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes. *Mol Cell Biol*, 28, 3894-904.
- THOMPSON, P. M., GOTOH, T., KOK, M., WHITE, P. S. & BRODEUR, G. M. 2003. CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene*, 22, 1002-11.
- THORNE, J. L., MAGUIRE, O., DOIG, C. L., BATTAGLIA, S., FEHR, L., SUCHESTON, L. E., HEINANIEMI, M., O'NEILL, L. P., MCCABE, C. J., TURNER, B. M., CARLBERG, C. & CAMPBELL, M. J. 2011. Epigenetic control of a VDR-governed feed-forward loop that regulates p21(waf1/cip1) expression and function in non-malignant prostate cells. *Nucleic Acids Res*, 39, 2045-56.
- TIROSH, I. & BARKAI, N. 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res*, 18, 1084-91.

- TONG, J. K., HASSIG, C. A., SCHNITZLER, G. R., KINGSTON, R. E. & SCHREIBER, S. L. 1998. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, 395, 917-21.
- TORRES-PADILLA, M. E., PARFITT, D. E., KOUZARIDES, T. & ZERNICKA-GOETZ, M. 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*, 445, 214-8.
- TRIEZENBERG, S. J. 1995. Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev*, 5, 190-6.
- TRYNDYAK, V. P., KOVALCHUK, O. & POGRIBNY, I. P. 2006. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther*, 5, 65-70.
- TURNER, B. M. 1993. Decoding the nucleosome. *Cell*, 75, 5-8.
- TURNER, B. M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22, 836-45.
- TURNER, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111, 285-91.
- TURNER, B. M., BIRLEY, A. J. & LAVENDER, J. 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila polytene* nuclei. *Cell*, 69, 375-84.
- UTLEY, R. T., IKEDA, K., GRANT, P. A., COTE, J., STEGER, D. J., EBERHARTER, A., JOHN, S. & WORKMAN, J. L. 1998. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, 394, 498-502.
- VAKOC, C. R., SACHDEVA, M. M., WANG, H. & BLOBEL, G. A. 2006. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol*, 26, 9185-95.
- VALAY, J. G., SIMON, M., DUBOIS, M. F., BENSAUDE, O., FACCA, C. & FAYE, G. 1995. The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol*, 249, 535-44.
- VALOUEV, A., ICHIKAWA, J., TONTHAT, T., STUART, J., RANADE, S., PECKHAM, H., ZENG, K., MALEK, J. A., COSTA, G., MCKERNAN, K., SIDOW, A., FIRE, A. & JOHNSON, S. M. 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res*, 18, 1051-63.
- VARGA-WEISZ, P. D. & BECKER, P. B. 1995. Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *FEBS Lett*, 369, 118-21.
- VASILJEVA, L., KIM, M., MUTSCHLER, H., BURATOWSKI, S. & MEINHART, A. 2008. The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 795-804.
- VISSERS, L. E., VAN RAVENSWAAIJ, C. M., ADMIRAAL, R., HURST, J. A., DE VRIES, B. B., JANSSEN, I. M., VAN DER VLIET, W. A., HUYS, E. H., DE JONG, P. J., HAMEL, B. C., SCHOENMAKERS, E. F., BRUNNER, H. G., VELTMAN, J. A. & VAN KESSEL, A. G. 2004. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet*, 36, 955-7.
- VOLPE, T. A., KIDNER, C., HALL, I. M., TENG, G., GREWAL, S. I. & MARTIENSSEN, R. A. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297, 1833-7.
- VON ZELEWSKY, T., PALLADINO, F., BRUNSCHWIG, K., TOBLER, H., HAJNAL, A. & MULLER, F. 2000. The *C. elegans* Mi-2 chromatin-remodelling proteins function in vulval cell fate determination. *Development*, 127, 5277-84.
- WADE, P. A., JONES, P. L., VERMAAK, D., VEENSTRA, G. J., IMHOF, A., SERA, T., TSE, C., GE, H., SHI, Y. B., HANSEN, J. C. & WOLFFE, A. P. 1998. Histone deacetylase directs the dominant silencing of transcription in chromatin: association with MeCP2 and the Mi-2 chromodomain SWI/SNF ATPase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63, 435-45.
- WAGNER, S., WEBER, S., KLEINSCHMIDT, M. A., NAGATA, K. & BAUER, U. M. 2006. SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1. *J Biol Chem*, 281, 27242-50.

- WANG, A. G., FANG, W., HAN, Y. H., CHO, S. M., CHOI, J. Y., LEE, K. H., KIM, W. H., KIM, J. M., PARK, M. G., YU, D. Y., KIM, N. S. & LEE, D. S. 2006a. Expression of the RERG gene is gender-dependent in hepatocellular carcinoma and regulated by histone deacetyltransferases. *J Korean Med Sci*, 21, 891-6.
- WANG, H. P., LONG, X. H., SUN, Z. Z., RIGAUD, O., XU, Q. Z., HUANG, Y. C., SUI, J. L., BAI, B. & ZHOU, P. K. 2006b. Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of gamma-ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity. *Int J Radiat Biol*, 82, 181-90.
- WANG, W., CAREY, M. & GRALLA, J. D. 1992. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science*, 255, 450-3.
- WANG, Y. & JIA, S. 2009. Degrees make all the difference: the multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation. *Epigenetics*, 4, 273-6.
- WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M. B., RAMOS, L., PAABO, S., REBHAN, M. & SCHUBELER, D. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, 39, 457-66.
- WHITEHOUSE, I., RANDO, O. J., DELROW, J. & TSUKIYAMA, T. 2007. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature*, 450, 1031-5.
- WIGLER, M., PELLICER, A., SILVERSTEIN, S., AXEL, R., URLAUB, G. & CHASIN, L. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1373-1376.
- WINSTON, F. & CARLSON, M. 1992. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet*, 8, 387-91.
- WORKMAN, J. L. & KINGSTON, R. E. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, 67, 545-79.
- WU, L., TIMMERS, C., MAITI, B., SAAVEDRA, H. I., SANG, L., CHONG, G. T., NUCKOLLS, F., GIANGRANDE, P., WRIGHT, F. A., FIELD, S. J., GREENBERG, M. E., ORKIN, S., NEVINS, J. R., ROBINSON, M. L. & LEONE, G. 2001. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 414, 457-62.
- WYRICK, J. J., HOLSTEGE, F. C., JENNINGS, E. G., CAUSTON, H. C., SHORE, D., GRUNSTEIN, M., LANDER, E. S. & YOUNG, R. A. 1999. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature*, 402, 418-21.
- WYRICK, J. J. & PARRA, M. A. 2009. The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: a genomic perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1789, 37-44.
- WYSOCKA, J., ALLIS, C. D. & COONROD, S. 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci*, 11, 344-55.
- XUE, Y., WONG, J., MORENO, G. T., YOUNG, M. K., COTE, J. & WANG, W. 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, 2, 851-61.
- YAMADA, K., FUKUSHI, D., ONO, T., KONDO, Y., KIMURA, R., NOMURA, N., KOSAKI, K. J., YAMADA, Y., MIZUNO, S. & WAKAMATSU, N. 2010. Characterization of a de novo balanced t(4;20)(q33;q12) translocation in a patient with mental retardation. *American journal of medical genetics. Part A*, 152A, 3057-67.
- YANG, H. & MIZZEN, C. A. 2009. The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochem Cell Biol*, 87, 151-61.
- YANG, X., ZAURIN, R., BEATO, M. & PETERSON, C. L. 2007. Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 540-7.
- YOKOMORI, K., VERRIJZER, C. P. & TJIAN, R. 1998. An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6722-7.
- YUAN, G. C., LIU, Y. J., DION, M. F., SLACK, M. D., WU, L. F., ALTSCHULER, S. J. & RANDO, O. J. 2005. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 309, 626-30.

- ZHANG, H., ROBERTS, D. N. & CAIRNS, B. R. 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123, 219-31.
- ZHANG, Y., LEROY, G., SEELIG, H. P., LANE, W. S. & REINBERG, D. 1998. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 95, 279-89.
- ZHANG, Z. & REESE, J. C. 2004. Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 23, 2246-57.
- ZHAO, Q., RANK, G., TAN, Y. T., LI, H., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J., CERRUTI, L., CURTIS, D. J., PATEL, D. J., ALLIS, C. D., CUNNINGHAM, J. M. & JANE, S. M. 2009. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 304-11.
- ZINSZNER, H., KURODA, M., WANG, X., BATCHVAROVA, N., LIGHTFOOT, R. T., REMOTTI, H., STEVENS, J. L. & RON, D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12, 982-95.